

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**  
**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE**  
**CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA**



**TESI DI LAUREA**

Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e  
Scienze Materno-Infantili (DINOEMI)

**Una misura residuale di NPTX2 liquorale identifica l'eterogeneità  
prognostica nella malattia di Alzheimer prodromica secondo un modello  
compensatorio**

**Relatore:**

*Dr. Federico Massa*

**Candidato:**

*Martina Giovanna Urbinati*

**Correlatore:**

*Prof. Matteo Pardini*

*Anno accademico 2025-2026*



A chi mi ha donato le ali,  
e uno spago invisibile  
per non smarrire mai la via di casa  
A mamma e papà,  
radici d'amore

Ad Anto,  
regalo più bello la vita non poteva farmi

# Sommario

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| SINOSI .....                                                                           | 2         |
| <b>1. INTRODUZIONE.....</b>                                                            | <b>5</b>  |
| <b>1.1 LA MALATTIA DI ALZHEIMER .....</b>                                              | <b>5</b>  |
| <b>1.2. IL CONTINUUM DELL'AD .....</b>                                                 | <b>5</b>  |
| 1.2.1. <i>Fisiopatologia della malattia di Alzheimer</i> .....                         | 6         |
| 1.2.2. <i>Stadiazione clinico-biologica dell'AD</i> .....                              | 9         |
| 1.2.3. <i>Stadiazione sindromica dell'AD</i> .....                                     | 14        |
| <b>2. I BIOMARCATORI DELL'ALZHEIMER.....</b>                                           | <b>18</b> |
| <b>2.1 BIOMARCATORI LIQUORALI SINAPTICI EMERGENTI.....</b>                             | <b>18</b> |
| 2.1.1 <i>Pentrassina neuronale-2 (NPTX2)</i> .....                                     | 19        |
| 2.1.2 <i>Neurogranina (Ng)</i> .....                                                   | 22        |
| <b>2.2 BIOMARCATORI DI IMAGING .....</b>                                               | <b>23</b> |
| 2.2.1 <i>Risonanza magnetica (RM)</i> .....                                            | 23        |
| 2.2.2 <i>Tomografia ad emissione di positroni (PET)</i> .....                          | 23        |
| 2.2.3 <i>Caratteristiche della [<sup>18</sup>F]FDG-PET nell'AD</i> .....               | 25        |
| 2.2.4 <i>Analisi Semiquantitativa e Automatica della [<sup>18</sup>F]FDG PET</i> ..... | 27        |
| <b>3. IL CONCETTO DI AD COME SINAPTOPATIA .....</b>                                    | <b>29</b> |
| <b>4. SCOPO DEL LAVORO .....</b>                                                       | <b>33</b> |
| <b>5. METODI .....</b>                                                                 | <b>38</b> |
| 5.1 PAZIENTI.....                                                                      | 38        |
| 5.2 MISURE DEI BIOMARCATORI LIQUORALI .....                                            | 39        |
| 5.3 ANALISI STATISTICA .....                                                           | 40        |
| 5.4 FRAMEWORK DI COMPENSAZIONE A DUE LIVELLI E INTERPRETABILITÀ CLINICA .....          | 42        |
| 5.5 ACQUISIZIONE E ANALISI STATISTICA DELLE [ <sup>18</sup> F]FDG PET .....            | 43        |
| <b>6. RISULTATI.....</b>                                                               | <b>46</b> |
| 6.1 DATI CLINICI E BIOMARCATORI NEL LIQUIDO CEREBROSPINALE (CSF) .....                 | 46        |
| 6.2 FRAMEWORK DI COMPENSAZIONE A DUE LIVELLI E TRADUZIONE CLINICA .....                | 59        |
| 6.3 ANALISI VOXEL-BASED (VBA) DELLA [ <sup>18</sup> F]FDG PET .....                    | 61        |
| <b>7. DISCUSSIONE.....</b>                                                             | <b>66</b> |
| <b>8. OSSERVAZIONI CONCLUSIVE E PROSPETTIVE FUTURE .....</b>                           | <b>73</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                                                              | <b>75</b> |

# Sinossi

**Introduzione.** La malattia di Alzheimer (AD) rappresenta la principale patologia neurodegenerativa nel mondo. La diagnosi biologica *in vivo* si avvale di biomarcatori in grado di riflettere le caratteristiche fisiopatologiche principali della malattia, ovvero l'accumulo di  $\beta$ -amiloide e la produzione di grovigli neurofibrillari di proteina tau iperfosforilata, consentendo l'identificazione dei pazienti nelle fasi precoci. Tuttavia, le informazioni in merito alla progressione clinica che questi forniscono sono limitate. Infatti, alterazioni comparabili di tali marcatori possono essere associate a traiettorie prognostiche differenti. Perciò negli ultimi anni l'attenzione si è spostata verso biomarcatori in grado di fornire informazioni prognostiche catturando dimensioni biologiche distinte e più vicine alla funzione e alla traduzione clinica, quali l'alterazione della sinapsi, processo precoce e significativo nella malattia di Alzheimer. In questo lavoro, ci siamo concentrati sulla possibilità di studiare la patologia della sinapsi tramite due proteine che si modificano nel liquido cefalorachidiano (cerebrospinal fluid, CSF) nel decorso della patologia alzheimeriana: i) Neurogranina (Ng), proteina post-sinaptica che è considerata una misura prossima al danno sinaptico, ii) e Neuropentrassina-2 (NPTX2), proteina coinvolta nell'omeostasi dei circuiti neuronali e nell'equilibrio tra eccitazione e inibizione a livello delle sinapsi. Da studi passati, queste due proteine si sono mostrate parzialmente correlate, pur mostrando una dinamica ed un significato biologico differente. Se Ng aumenta in maniera relativamente specifica nel CSF dei pazienti con AD, NPTX2 è stata descritta in progressiva diminuzione in parallelo al declino cognitivo in diverse patologie neurodegenerative. Tuttavia, recenti evidenze hanno portato all'attenzione un andamento peculiare di questa proteina, descrivendo un aumento di NPTX2 nelle fasi precoci della malattia ed anche nei soggetti preclinici (ovvero, asintomatici pur in presenza di alterazioni biologiche già misurabili). Tale aumento si associava ad un significato prognosticamente favorevole in termini di rischio di declino cognitivo nel tempo, e non è stato ancora pienamente caratterizzato e compreso. In questo lavoro abbiamo cercato di focalizzarci specificamente su questo aspetto, e ci siamo quindi chiesti se CSF NPTX2 contenesse una componente biologica distinta, non completamente spiegata dal danno sinaptico e maggiormente legata alla capacità adattativa di network all'interno di un quadro compensatorio, utilizzando l'evoluzione clinica e il metabolismo cerebrale quali misure convergenti per valutare tale ipotesi.

**Metodi.** Abbiamo selezionato retrospettivamente 104 pazienti affetti da Mild Cognitive Impairment (MCI) tipico dovuto a malattia di Alzheimer. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a puntura lombare per analisi del CSF, con dosaggio dei biomarcatori *core* dell'AD (misure di amiloide e taupatia), di NPTX2 e Ng attraverso immunodosaggi validati. I pazienti sono poi stati stratificati in due sottogruppi utilizzando un criterio temporale, ovvero in base alla prossimità alla progressione a demenza: Late MCI (LMCI), comprendente i pazienti che progredivano a demenza entro due anni; Early MCI (EMCI), che includeva i soggetti che

progredivano oltre i due anni o rimanevano stabili nel periodo di osservazione. Per isolare la componente di NPTX2 indipendente dal danno sinaptico e dalla severità di malattia, è stata ottenuta una misura residuale (Res\_NPTX2) da un modello di regressione che includeva  $z(\text{NPTX2})$  (i.e., la misura di CSF NPTX2 standardizzata come z-score sulla popolazione dei pazienti) su  $z(\text{Ng})$ , un indice di AD Burden (basato sul rapporto tau/amiloide derivanti da misure liquorali, anch'esse trasformate in z-score), e l'età. In seguito, sono state valutate le associazioni tra Res\_NPTX2 con il punteggio MMSE al baseline (BS) e longitudinale e con il tempo-di-progression a demenza mediante modelli lineari e di sopravvivenza. In tutti i pazienti sono anche state analizzate le scansioni cerebrali di [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET ottenute nel contesto dell'inquadramento diagnostico, utilizzando metodi voxel-based (VBA) al fine di individuare i correlati metabolici di NPTX2 e Res\_NPTX2, in relazione alle regioni relativamente ipometaboliche associate a malattia di Alzheimer.

**Risultati.** CSF Ng ha mostrato una forte correlazione con CSF NPTX2 ( $p=0.67$ ,  $p<0.001$ ). Res\_NPTX2 risultava più elevato nei soggetti EMCI rispetto a quelli LMCI ( $p=0.0006$ ), si associava a un migliore punteggio MMSE BS ( $p=0.008$ ), e a un minore declino di MMSE nel tempo ( $p=0.002$ ). Durante il follow-up, 55/104 pazienti (52.9%) sono progrediti a demenza. Un valore più elevato di Res\_NPTX2 era predittivo per un minor rischio di progressione ( $\text{HR}=0.63$ ,  $p=0.007$ ), associazione che rimaneva significativa anche dopo correzione per il punteggio MMSE al baseline. Le curve di Kaplan-Meier differivano tra i terzi di Res\_NPTX2, mostrando una netta riduzione della progressione in pazienti nel terzile più alto, con una separazione più evidente nei primi 2 anni (high vs low:  $\text{HR}=0.18$ ,  $p=0.008$ ). Analizzando le scansioni di [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET, i soggetti LMCI mostravano un quadro di relativo ipometabolismo più marcato nelle regioni posteriori sinistre rispetto ai pazienti EMCI, ad indicare un maggiore coinvolgimento dell'emisfero sinistro nei soggetti con malattia più prossima alla demenza. Inoltre, CSF NPTX2 e Res\_NPTX2 erano correlate a patterns metabolici distinti, che vedevano il coinvolgimento rispettivamente delle regioni parietali posteriori sinistre e di quelle fronto-striatali nell'emisfero destro.

**Discussione.** Tramite l'approccio di residualizzazione, è stata ottenuta una metrica statistica che ha consentito di isolare la componente di NPTX2 ortogonale al danno sinaptico (rappresentato da Ng), al carico patologico di AD e all'età, associata invece a un migliore livello cognitivo, a una progressione clinica più lenta e a un minor rischio di progressione a demenza. Inoltre, la presenza di una specifica firma metabolica nella regione fronto-striatale destra correlata a Res\_NPTX2 riflette una associazione con regioni generalmente più risparmiate dalla patologia in fase precoce – nell'emisfero destro, ovvero quello meno affetto dalla patologia nella nostra coorte. I risultati ottenuti indicano che NPTX2 non rappresenti esclusivamente un indice di disfunzione sinaptica, ma potrebbe fornire informazioni prognostiche maggiormente correlate a una capacità adattativa del funzionamento della sinapsi e del compenso di rete, in quello che può essere proposto come un quadro compensativo.

**Conclusioni.** Nelle fasi prodromiche dell'AD, CSF NPTX2 contiene informazioni clinicamente rilevanti che vanno oltre a quelle fornite da Ng e dai biomarker *core* di patologia alzheimeriana. L'approccio di residualizzazione proposto fornisce una strategia statistica per isolare una componente correlata a NPTX2 associata a migliori prestazioni cognitive, a un minor rischio di progressione a breve termine, e a una specifica firma metabolica fronto-striatale. Nell'ambito di un quadro compensatorio, questo segnale potrebbe essere l'indice di una capacità adattativa di network e di resilienza e potrebbe contribuire a caratterizzare l'eterogeneità clinica significativa nelle fasi precoci della malattia di Alzheimer.

# 1. Introduzione

## 1.1 La Malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è considerata la principale forma di demenza a livello globale, con una diffusione compresa tra il 60% e l'80% dei casi (Alzheimer's Disease Facts and Figures, 2020). Pertanto, rappresenta una delle maggiori sfide della sanità pubblica contemporanea, a causa dell'elevato impatto economico, del tasso di mortalità e della disabilità che ne deriva (Scheltens et al., 2021). Questa patologia è caratterizzata da una progressiva neurodegenerazione che vede il coinvolgimento di estese porzioni della corteccia cerebrale e dell'ippocampo (Masters et al., 2015). Nella forma classica, il sintomo cognitivo più evidente è un disturbo di memoria progressivamente ingravescente, che nel tempo si accompagna al coinvolgimento di altri domini cognitivi, quali le funzioni visuo-costruttive, esecutive ed il linguaggio (Graff-Radford et al., 2021). Oltre ai sintomi cognitivi, negli anni si sviluppano una serie di manifestazioni non cognitive, come il declino fisico progressivo e alterazioni comportamentali, che nel loro insieme determinano una perdita delle autonomie e il bisogno di assistenza continua nelle attività quotidiane (Hersi et al., 2017).

## 1.2. Il Continuum dell'AD

L'AD è oggi intesa come un processo biologico continuo che si sviluppa ben prima della comparsa dei sintomi clinici, superando il modello tradizionale a stadi discreti. Secondo i criteri aggiornati dell'Alzheimer's Association (Jack et al., 2024), l'AD è definita primariamente dalle sue caratteristiche neuropatologiche - in particolare dall'accumulo di  $\beta$ -amiloide e tau - rilevabili attraverso biomarcatori, potenzialmente anche in soggetti ancora asintomatici. Questa ridefinizione sottolinea la necessità di distinguere tra malattia (legata alla biologia) e sindrome (quindi la manifestazione clinica), riconoscendo che i sintomi cognitivi emergono solo successivamente, come conseguenza della progressione del danno biologico (Jia et al., 2024). In questa prospettiva, la presenza di biomarcatori patologici configurerebbe già una diagnosi di malattia, indipendentemente dai sintomi, e individui senza deficit clinici ma con anomalie biomolecolari sarebbero considerati affetti da AD in fase preclinica (Jack et al., 2024; Aisen et al., 2017). Questa visione puramente biologica

risulta tuttavia dibattuta a livello internazionale, e recenti raccomandazioni a stampo europeo si mostrano più caute nel diagnosticare una AD nel soggetto normale sul piano cognitivo (Dubois et al., 2024). Tale atteggiamento è ragionevolmente spiegato dall'incertezza circa la progressione a breve-medio termine alla fase sintomatica in soggetti positivi ai biomarcatori, in considerazione di diversi fattori di resistenza, resilienza o co-patologie che mediano l'evoluzione della malattia (Jagust et al., 2023).

### 1.2.1. Fisiopatologia della malattia di Alzheimer

L'AD, dal punto di vista fisiopatologico, è definita da un insieme complesso e progressivo di processi patogenetici che vedono il coinvolgimento di differenti domini cerebrali. Il framework proposto da Jack et al. (2024) consente di classificare tali processi in tre grandi categorie: le alterazioni legate all'accumulo di  $\beta$ -amiloide e alla fosforilazione della tau, noti per essere le due alterazioni neuropatologiche caratteristiche della malattia (domini A e T), i meccanismi neurodegenerativi e neuroinfiammatori più generali (domini N e I), e infine i processi associati a patologie frequentemente concomitanti, come le alterazioni vascolari e la patologia sinucleinica (domini V e S). Queste componenti, pur riferendosi a meccanismi distinti, si intrecciano nella progressione della malattia, contribuendo alla sua eterogeneità sia dal punto di vista clinico sia biologico. Questo framework riflette la crescente consapevolezza della natura eterogenea e multifattoriale dell'Alzheimer, e la sempre maggiore esigenza di strumenti in grado di cogliere l'intera complessità patobiologica della malattia (Jack et al., 2024).

La proteina  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) riveste un ruolo centrale nella patogenesi dell'AD secondo l'ipotesi della "cascata amiloide" formulata da Hardy e Higgins (1992), secondo cui il deposito di  $A\beta$  rappresenta l'evento iniziale che innesci il declino cognitivo progressivo. Sebbene  $A\beta$  sia fisiologicamente prodotto a livello neuronale attraverso la proteolisi dell'APP da parte della  $\beta$ -secretasi (BACE-1) e della  $\gamma$ -secretasi (contenente PSEN1), un'alterazione di questo processo lungo la via amiloidogenetica determina un disequilibrio tra produzione, aggregazione e rimozione dei peptidi, con conseguente accumulo extracellulare in forma di placche neuritiche (Querfurth & LaFerla, 2010).

Parallelamente alle modificazioni della  $\beta$ -amiloide, anche la proteina tau subisce alterazioni patologiche che contribuiscono in modo determinante alla progressione della AD.

Normalmente presente in forma solubile all'interno degli assoni, la proteina tau è essenziale per la stabilità dei microtubuli e per il corretto trasporto vescicolare lungo il citoscheletro neuronale (Y. Wang & Mandelkow, 2016). Nell'AD, però, la sua funzione viene compromessa da un'anomala iperfosforilazione, in seguito alla quale la proteina perde affinità per i microtubuli, diventa insolubile e si auto-aggrega in strutture filamentose note come grovigli neurofibrillari (NFTs) (Querfurth & LaFerla, 2010). Sebbene questo processo si sviluppi a valle del deposito di  $\beta$ -amiloide (Li et al., 2018), l'accumulo di tau patologica rappresenta il principale fattore associato alla neurodegenerazione e al declino cognitivo nell'AD (Long & Holtzman, 2019).

Il deposito di A $\beta$  e tau nell'AD segue traiettorie topografiche distinte ma in parte sovrapponibili, a indicare meccanismi patogenetici autonomi ma sinergici (Masters et al., 2015). L'accumulo di A $\beta$  inizia tipicamente nelle aree associative della neocorteccia, per poi estendersi progressivamente verso le strutture più profonde come l'ippocampo, i gangli della base e infine il cervelletto, secondo una sequenza in cinque fasi neuropatologiche descritte da Thal et al. (2002). Al contrario, l'accumulo di proteina tau iperfosforilata segue una progressione più strettamente correlata alla compromissione clinica, che ha origine nella corteccia entorinale, coinvolge successivamente l'ippocampo e si diffonde infine alla neocorteccia, secondo i sei stadi di Braak (Braak & Braak, 1991).

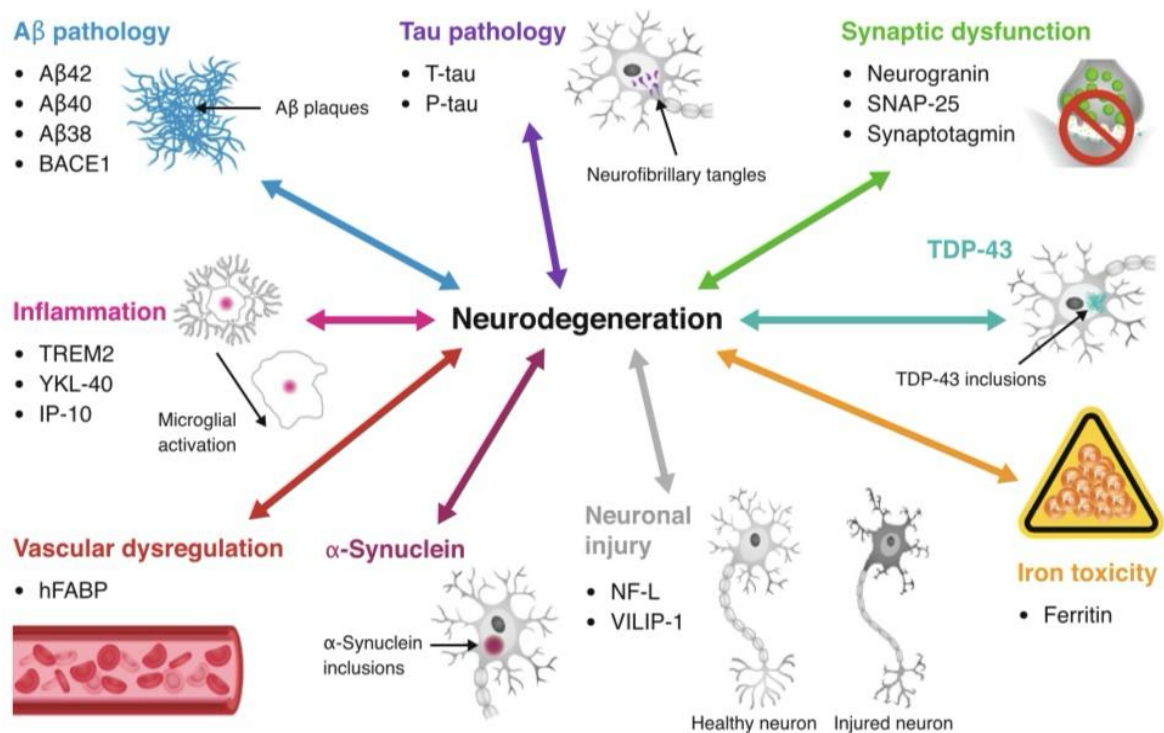
La neurodegenerazione (N) nell'AD si esprime attraverso una progressiva perdita neuronale e una compromissione della funzione e dell'integrità delle sinapsi. Quest'ultima, definita sinaptopatia, rappresenta un evento chiave nelle fasi iniziali della cascata patogenetica della malattia. Tale compromissione è indotta da entrambe le proteine patologiche caratteristiche della malattia: A $\beta$  e tau iperfosforilata. In particolare, A $\beta$  interferisce con i meccanismi di plasticità sinaptica, compromettendo la Long-Term Potentiation (LTP) attraverso l'iperattivazione dei recettori glutammatergici NMDA (NMDAR), con un conseguente eccessivo ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  nel neurone. Ciò induce l'attivazione di vie intracellulari - tra cui calpaina, calcineurina, PP2A e Fyn - che portano alla disfunzione sinaptica e all'eccitotossicità (Li et al., 2018). Ulteriori approfondimenti su questi meccanismi saranno sviluppati nei Capitoli 2 e 3.

Oltre ai meccanismi specifici dell'AD, il quadro neuropatologico include alterazioni condivise con altre patologie neurodegenerative, come la neuroinfiammazione. Infatti, le placche A $\beta$  e i NFTs stimolano un'intensa risposta immunitaria cerebrale, dominata dall'attivazione di microglia e astrociti (Molinuevo et al., 2018; Toledo et al., 2013). Se tale risposta neuroinfiammatoria è inizialmente protettiva, nel lungo termine può risultare però controproducente: infatti, la persistenza della *noxa patogena* comporta attivazione microgliale cronica ed astrogliosi, fenomeni che mantengono nel tempo un milieu infiammatorio con il rilascio di citochine pro-infiammatorie, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ossido nitrico, che aggravano ulteriormente il processo neuropatologico, e di conseguenza il danno neuronale. Inoltre, queste stesse molecole possono a loro volta promuovere la sintesi di A $\beta$  e la iperfosforilazione di tau, alimentando un circolo vizioso neurotossico.

Questi processi, pur non essendo esclusivi dell'AD, giocano un ruolo centrale nella progressione clinica, contribuendo alla perdita neuronale, alla compromissione sinaptica e alla propagazione del danno attraverso circuiti cerebrali vulnerabili.

Numerose evidenze indicano che la disfunzione sinaptica si verifica prima della perdita neuronale evidente e mostra una correlazione più stretta con il deterioramento cognitivo rispetto alla sola presenza di  $\beta$ -amiloide o tau. Nei modelli animali, alterazioni sinaptiche a carico dell'ippocampo sono osservabili già in fase preclinica, prima della comparsa dei grovigli neurofibrillari (NFTs) (Li et al., 2018). Inoltre, studi post-mortem hanno evidenziato che, in molte aree corticali, la perdita sinaptica è più marcata rispetto a quella neuronale, rafforzando così il ruolo centrale della sinaptopatia nella progressione della malattia (Lleó et al., 2019).

Infine, in numerosi casi di AD, il quadro neuropatologico si arricchisce della presenza di copatologie cerebrali non specifiche, ma frequentemente concomitanti, che possono influenzarne l'evoluzione clinica e la risposta ai trattamenti. Tra queste, le alterazioni vascolari cerebrali e le altre proteinopatie, come le sinucleinopatie e l'accumulo citoplasmatico di TDP-43, contribuiscono a definire un profilo patogenetico più complesso ed eterogeneo, spesso aggravando il declino cognitivo e modificando la traiettoria clinica della malattia.



**Figura 1.** Meccanismi patologici implicati nell'AD e biomarcatori associati nei fluidi biologici. In questa figura, le frecce rappresentano relazioni ipotetiche, non legami causali diretti tra i meccanismi patologici e la neurodegenerazione.

### 1.2.2. Stadiazione clinico-biologica dell'AD

Nella descrizione della progressione dell'AD, è utile distinguere due modalità complementari di stadiazione: una clinico-biologica, basata sui biomarcatori e sull'evidenza della patologia sottostante, e una sindromica, centrata invece sull'evoluzione dei sintomi clinici e sul declino funzionale. La stadiazione clinico-biologica consente di descrivere in modo più preciso l'avanzamento della malattia a livello cerebrale, mentre quella sindromica permette di valutare il grado di compromissione cognitiva e funzionale visibile nel paziente.

Per riconoscere precocemente l'AD e definirne le caratteristiche biologiche, la ricerca e la diagnosi si avvalgono di strumenti fondamentali: i biomarcatori. Secondo la definizione del Biomarkers Definitions Working Group (2001), i biomarcatori sono indicatori oggettivamente misurabili di processi biologici normali, patologici o associati alla risposta a trattamenti. Questi verranno dettagliati nel capitolo 2.

Nel contesto dell'AD, l'obiettivo ideale è disporre di biomarcatori che siano non invasivi, economici, riproducibili, specifici e in grado di fornire informazioni affidabili in ogni fase della malattia, inclusa quella preclinica. Seguendo il modello fisiopatologico precedentemente delineato (Jack et al., 2024), i biomarcatori A e T sono oggi considerati *core* per la diagnosi biologica dell'AD. La neurodegenerazione (N), pur non essendo specifica per l'AD, fornisce invece informazioni cruciali sulla gravità e sull'evoluzione del danno cerebrale. Ad essi si aggiungono indicatori di neuroinfiammazione e attivazione gliale (I), danno vascolare cerebrale (V) e di altre proteinopatie frequentemente associati. Questi marcatori possono essere rilevati tramite diverse tecniche: liquido cerebrospinale (CSF), plasma (attualmente in corso di validazione clinica), e neuroimaging, in particolare tramite la PET con traccianti per amiloide e tau, la [<sup>18</sup>F]FDG PET e la RMN strutturale (tabella 1)

**Tabella 1.** *Categorie e suddivisioni dei biomarcatori per la diagnosi della malattia di Alzheimer*

| Categoria di Biomarcatori                                                            | Analiti in CSF o Plasma                                                                                          | Tecniche di Imaging                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Biomarcatori <i>Core</i>                                                             |                                                                                                                  |                                                         |
| <i>Core 1</i><br>A (proteinopatia da A $\beta$ )                                     | A $\beta$ 42<br>T1 (tau fosforilata e secreta nell'Alzheimer)<br>p-tau217, p-tau181, p-tau231                    | PET amiloide                                            |
| <i>Core 2</i><br>T2 (proteinopatia tau nell'Alzheimer)                               | MTBR-tau243, altre forme di tau fosforilata (es. p-tau205), frammenti tau della regione centrale non fosforilati | PET tau                                                 |
| Biomarcatori di processi non specifici coinvolti nella fisiopatologia dell'Alzheimer |                                                                                                                  |                                                         |
| N (lesione, disfunzione o degenerazione del neuropilo)                               | NfL (Neurofilamenti a catena leggera)                                                                            | Risonanza magnetica anatomica, PET con FDG              |
| I (infiammazione)                                                                    | Attivazione astrocitaria (GFAP)                                                                                  |                                                         |
| Biomarcatori di copatologie non-Alzheimer                                            |                                                                                                                  |                                                         |
| V (danno vascolare cerebrale)                                                        |                                                                                                                  | Infarti su RM o TC, lesioni della sostanza bianca (WMH) |
| S ( $\alpha$ -sinucleina)                                                            | $\alpha$ Syn-SAA                                                                                                 |                                                         |

Una distinzione fondamentale, adottata anche nella classificazione proposta da Jack et al. (2024), è quella tra biomarcatori di imaging e biomarcatori derivati da fluidi biologici. I

primi riflettono effetti cumulativi della patologia e consentono una mappatura spaziale e topografica delle alterazioni cerebrali, sovrapponendosi a costrutti neuropatologici consolidati. Le tecniche di imaging, in particolare la PET per amiloide e tau, consentono di visualizzare aggregati insolubili direttamente nel tessuto cerebrale. I biomarcatori fluidi, come quelli ottenuti da sangue o liquido cerebrospinale (CSF), rappresentano invece una misura dinamica e temporanea dei processi molecolari in atto, in quanto derivano dall'equilibrio tra produzione e rimozione degli analiti specifici.

I biomarcatori di neuroimaging rappresentano quindi strumenti fondamentali per la caratterizzazione precoce e la comprensione dei processi neuropatologici alla base dell'AD, fornendo informazioni complementari sia sullo stato strutturale sia su quello funzionale del cervello. Le due principali tecniche utilizzate a questo scopo sono la risonanza magnetica (RM) e la tomografia a emissione di positroni (PET).

Come precedentemente definito, un biomarcatore ideale per la diagnosi della Malattia di Alzheimer dovrebbe essere affidabile, riproducibile, specifico per la patologia, semplice da misurare, poco costoso e, se possibile, non invasivo. In questo contesto, l'analisi CSF rappresenta un'eccezione rispetto a quest'ultimo criterio: pur richiedendo una procedura invasiva, quale la puntura lombare, essa offre una finestra biochimica diretta sui processi patologici cerebrali, rivelandosi particolarmente utile nelle fasi iniziali della malattia (Robert A. Fishman, 1992). È uno strumento diagnostico cruciale, soprattutto nelle fasi prodromiche dell'AD, poiché le alterazioni nei livelli di specifiche proteine riflettono processi neuropatologici legati alla produzione e clearance di tali molecole. Inoltre, l'intervallo dinamico delle proteine nel CSF è meno variabile, e la presenza di proteine ad alta concentrazione facilita l'identificazione di quelle a bassa concentrazione (Blennow et al., 2010).

In particolare, nella pratica clinica, l'analisi del CSF si concentra su:

- La proteina Amiloide  $\beta$ 1-42, che diminuisce nel CSF a causa di un maggiore sequestro a livello cerebrale nelle placche extracellulari, che hanno però una clearance ridotta;
- Il rapporto Amiloide  $\beta$ 1-42/Amiloide  $\beta$ 1-40, che consente di interpretare la riduzione dell'A $\beta$ 1-42 alla luce della produzione individuale totale di amiloide. Questo rapporto, infatti, corregge le variazioni fisiologiche nella produzione di A $\beta$  valutando la quota

della forma più aggregante (A $\beta$ 1-42) rispetto a quella più stabile (A $\beta$ 1-40), aumentando così l'accuratezza diagnostica;

- La proteina Tau fosforilata alla treonina 181 (p-Tau), associata alla formazione dei grovigli neurofibrillari, che è soggetta a iperfosforilazione e aggregazione, con un conseguente aumento dei suoi livelli nel liquido cefalorachidiano;
- La proteina Tau totale (t-Tau), che riflette la degenerazione e perdita neuronale, la cui concentrazione nel CSF aumenta.

Recentemente, Delaby et al. (2022) hanno proposto una sintesi armonizzata per l'interpretazione dei profili dei biomarcatori nel CSF per la diagnosi di AD, come mostrato nella Tabella 2.

**Tabella 2.** Riassunto dei commenti di consenso sull'interpretazione dei profili dei biomarcatori della malattia di Alzheimer (AD) nel liquido cerebrospinale (CSF) (Delaby et al., 2022)

| A $\beta$ | t-Tau | p-Tau(181) | Commenti di consenso                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------|-------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| N         | N     | N          | Profilo biochimico non coerente con la malattia di Alzheimer.                                                                                                                                                                                                                                                            |
| P         | P     | P          | Profilo biochimico coerente con la malattia di Alzheimer.                                                                                                                                                                                                                                                                |
| P         | N     | N          | Profilo biochimico coerente con un'amiloidopatia.                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| N         | P     | N          | Il profilo biochimico non è coerente con la malattia di Alzheimer; può essere coerente con altre malattie neurodegenerative e/o danni neuronali. (Se la t-Tau è vicina/superiore al limite superiore di rilevazione con un elevato rapporto t-Tau/p-Tau(181), il profilo può indicare la malattia di Creutzfeldt-Jakob). |
| P         | P     | N          | Profilo biochimico atipico; può essere coerente con la malattia di Alzheimer.                                                                                                                                                                                                                                            |
| P         | N     | P          | Profilo biochimico atipico; coerente con la malattia di Alzheimer.                                                                                                                                                                                                                                                       |
| N         | P     | P          | Profilo biochimico atipico; non coerente con la malattia di Alzheimer.                                                                                                                                                                                                                                                   |
| N         | N     | P          | Profilo biochimico atipico; non coerente con la malattia di Alzheimer.                                                                                                                                                                                                                                                   |

Abbreviazioni: N, normale; P, patologico; p-Tau (181), tau fosforilata alla treonina 181; t-Tau, tau totale

Grazie all'evoluzione tecnologica e alla capacità di misurare contemporaneamente numerosi analiti con metodi automatizzati, che assicurano una standardizzazione tra i centri, e una crescente sensibilità verso concentrazioni minime, si sta intensificando la ricerca di nuovi biomarcatori molecolari nel CSF (Ausó et al., 2020). In particolare, l'attenzione della ricerca si sta focalizzando sempre di più su quelle proteine in grado di rilevare precocemente danni assonali, degenerazione sinaptica e neuroinfiammazione (Kanaan et al., 2013).

### 1.2.3. Stadiazione sindromica dell'AD

A differenza della classificazione clinico-biologica, la stadiazione sindromica si concentra non tanto sull'eziologia sottostante, quanto piuttosto sul grado di compromissione cognitiva e sull'impatto funzionale che questa esercita sull'autonomia del soggetto. In quest'ottica, il continuum clinico-cognitivo viene suddiviso in tre categorie principali: soggetti cognitivamente normali (CU), soggetti con compromissione cognitiva lieve (MCI), e soggetti con demenza, quest'ultima a sua volta articolata in tre stadi di gravità (lieve, moderata, severa). Questo approccio è largamente utilizzato sia nella pratica medica quotidiana sia nei grandi studi epidemiologici e clinici (Jack et al., 2024; Petersen et al., 2018), ed è codificato anche nel DSM-5 attraverso le etichette di "lieve disturbo neurocognitivo" e "disturbo neurocognitivo maggiore" (American Psychiatric Association, 2013).

Il continuum clinico dell'AD ha inizio nella fase definita come cognitivamente normale (CU, cognitively unimpaired), in cui l'individuo non presenta alterazioni cognitive clinicamente rilevanti né difficoltà funzionali. In questa fase, la riserva cognitiva e i meccanismi di compensazione neurale contribuiscono a mantenere prestazioni nella norma, nonostante la presenza di iniziali alterazioni neuropatologiche.

Con l'emergere di sintomi cognitivi lievi, spesso soggettivi e riferiti dal paziente o dai familiari, si entra in una fase prodromica. Quando tali disturbi non si accompagnano a deficit oggettivabili ai test neuropsicologici, si parla di stadio pre-MCI. Sebbene clinicamente sfuggente, questa fase è di crescente interesse per il suo potenziale prognostico.

Il passaggio successivo è rappresentato dalla compromissione cognitiva lieve (MCI, Mild Cognitive Impairment). L'MCI rappresenta una fase intermedia tra l'invecchiamento cognitivo fisiologico e la demenza (Petersen et al., 2014). Secondo i criteri diagnostici proposti, la diagnosi di MCI richiede la presenza di una percezione soggettiva di declino cognitivo, evidenza oggettiva di deficit in uno o più domini cognitivi - come memoria, linguaggio, funzioni esecutive, attenzione e abilità visuospatiali -, il mantenimento dell'autonomia nelle attività della vita quotidiana, e l'assenza di uno stato dementigeno

conclamato. Le prestazioni ai test neuropsicologici si collocano solitamente tra 1 e 1,5 deviazioni standard al di sotto della media, tenendo conto di età e livello di istruzione.

La formulazione originaria del concetto di MCI, inizialmente centrata prevalentemente sul dominio della memoria (MCI amnestico), è stata successivamente ampliata a seguito del Key Symposium del 2003, che ne ha riconosciuto la natura eterogenea e ha quindi introdotto la distinzione tra sottotipi amnestici e non amnestici, sia in forma isolata sia multi-dominio (Petersen et al., 2014). In particolare, il sottotipo amnestico (a-MCI), isolato o associato ad altri domini cognitivi, rappresenta la forma più comune nei soggetti con AD, mentre le varianti non amnestiche sono meno frequenti e più spesso associate ad altre patologie neurodegenerative o cerebrovascolari.

Le traiettorie cliniche evolutive non sono però tutte uguali. A tal proposito, il Mild Cognitive Impairment (MCI) può essere concepito come un continuum eterogeneo caratterizzato da traiettorie di progressione differenti. Infatti, accanto ai pazienti che restano cognitivamente stabili per molti anni, ce ne sono altri che invece mostrano una progressione più rapida verso la demenza.

Tale eterogeneità clinica e prognostica ha portato alla necessità di suddividere l'MCI in differenti sottostadi, con l'obiettivo di identificare soggetti in fasi più precoci o più avanzate del processo neurodegenerativo. Sono due i metodi principali usati per distinguere gli Early MCI (EMCI) dai Late MCI (LMCI). Nell'ambito della Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), ad esempio, è stato considerato un criterio di severità clinica, basato su specifici cut-off ai test di memoria episodica (Aisen et al., 2010 ; Edmonds et al. 2019). Un approccio alternativo distingue invece i sottogruppi di MCI sulla base della vicinanza temporale alla progressione a demenza. Secondo questo metodo, la classificazione in EMCI e LMCI dipende quindi da un criterio temporale: i soggetti che convertono entro un cutoff arbitrario (ad esempio due anni) vengono identificati come LMCI, mentre quelli che progrediscono dopo 2 anni o rimangono stabili durante l'osservazione sono considerati EMCI. Quest'ultimo criterio è stato utilizzato anche nel presente studio, così come in altri nostri lavori precedenti (Massa et al., 2024; Massa et al., 2022).

**Tabella 3.** MCI - Criteri clinici per la diagnosi della sindrome clinica e cognitiva

| <b>Criteri Clinici per la Diagnosi di MCI (Petersen et al., 2014)</b>                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Presenza di una percezione soggettiva di cambiamento cognitivo, riportata dal paziente, da un familiare o da un clinico esperto.                                                                      |
| Deficit in uno o più domini cognitivi, superiore a quanto atteso per età e livello di istruzione. Questo può riguardare memoria, funzioni esecutive, attenzione, linguaggio o abilità visuo-spaziali. |
| Mantenimento dell'indipendenza nelle attività quotidiane, sebbene con lievi difficoltà nelle attività più complesse.                                                                                  |
| Assenza di demenza, con deficit cognitivo lieve che non compromette in modo significativo la vita sociale o lavorativa.                                                                               |
| Evidenza oggettiva del deterioramento cognitivo, con performance ai test cognitivi generalmente comprese tra 1 e 1,5 deviazioni standard sotto la media per età e istruzione.                         |

La fase demenziale è caratterizzata invece da una compromissione funzionale progressiva. Nella demenza lieve, il paziente inizia a perdere autonomia nelle attività strumentali (IADL), come la gestione del denaro, della casa o dei farmaci, pur mantenendo una relativa indipendenza. Con il peggioramento delle funzioni cognitive, nella demenza moderata si perde la capacità di svolgere anche attività di base (BADL), quali vestirsi, lavarsi o alimentarsi. In questa fase sono frequenti disturbi del comportamento (apatia, agitazione, disinibizione) che aumentano il carico assistenziale. Nella fase severa, infine, il paziente diventa completamente dipendente, con grave deterioramento cognitivo, linguaggio compromesso, ridotta mobilità e alta vulnerabilità a complicanze mediche, come infezioni respiratorie o polmoniti da ab ingestis, che rappresentano una delle principali cause di morte nei soggetti con AD avanzato (Murray & Lopez, 2013).

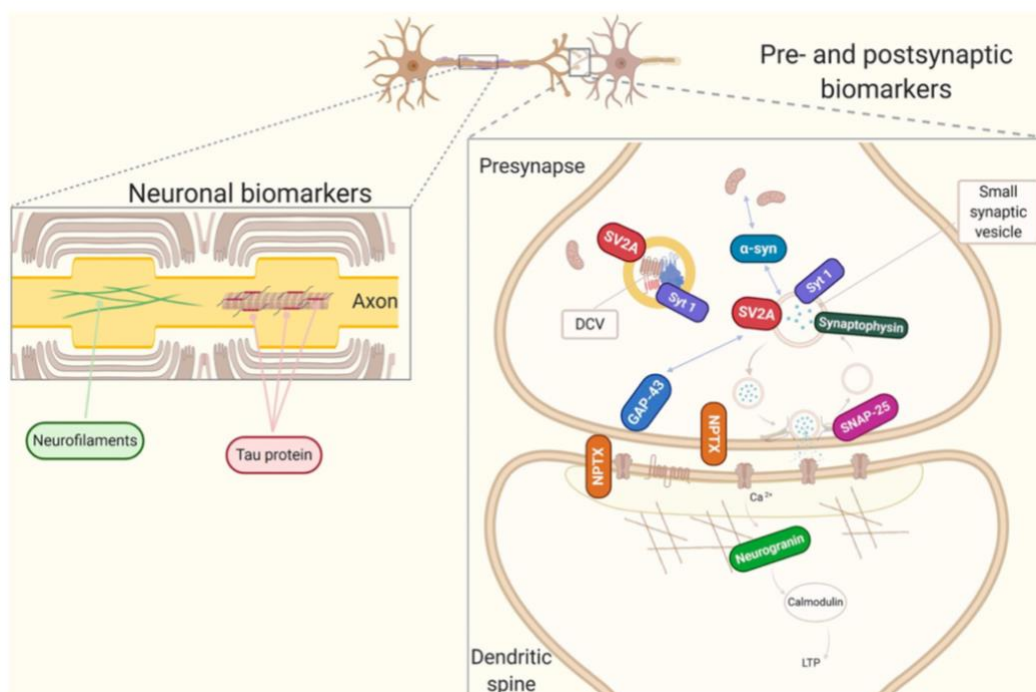
**Tabella 4.** *Stadiazione sindromica del continuum cognitivo*

| Categoria                         | Descrizione clinica e funzionale                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clinicamente non compromesso (CU) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Prestazioni cognitive nella norma attesa per l'individuo, basate su giudizio clinico e/o test cognitivi (con o senza confronto con dati normativi, eventualmente corretti per età, istruzione, occupazione, sesso, ecc.).</li> <li>- Le prestazioni possono risultare anomale rispetto alla norma della popolazione, ma rientrare comunque nell'atteso per il soggetto.</li> <li>- Un sottogruppo può riferire declino cognitivo soggettivo e/o mostrare un calo sottile nei test cognitivi seriali.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Lieve compromissione cognitiva    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Prestazioni cognitive al di sotto del livello atteso per l'individuo, valutate tramite giudizio clinico e/o test cognitivi.</li> <li>- Spesso i punteggi risultano anormali rispetto alla popolazione, ma ciò non è strettamente necessario se c'è evidenza di compromissione rispetto alla baseline individuale.</li> <li>- Deve essere presente un declino rispetto al funzionamento precedente, riferito dal soggetto, da un informatore o documentato da test longitudinali.</li> <li>- Il quadro può includere forme non amnestiche.</li> <li>- Alterazioni neurocomportamentali (es. umore, motivazione, ansia) possono essere presenti e anche predominanti.</li> <li>- Le attività quotidiane sono svolte in autonomia, ma possono esserci lievi difficoltà in quelle più complesse (IADL), riferite dal soggetto o da un informatore.</li> </ul> |
| Demenza                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Compromissione cognitiva progressiva e marcata, che interessa più domini e/o accompagnata da sintomi neurocomportamentali.</li> <li>- Rilevata dal soggetto, da un informatore o tramite peggioramento nei test cognitivi longitudinali.</li> <li>- Il deterioramento comporta un impatto funzionale evidente sulla vita quotidiana: il soggetto non è più pienamente autonomo e necessita di assistenza.</li> <li>- Può essere suddivisa in lieve, moderata o grave, in base al grado di compromissione funzionale.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

## 2. I biomarcatori dell'Alzheimer

### 2.1 Biomarcatori liquorali sinaptici emergenti

Accanto ai biomarcatori liquorali già consolidati per amiloidosi, taupatia e morte neuronale, nuovi marcatori potrebbero offrire una visione più ampia sugli eventi patologici che si verificano parallelamente nell'AD. In particolare, dato che l'alterazione delle sinapsi rappresenta un fenomeno precoce nello sviluppo dell'AD, l'interesse verso i biomarcatori sinaptici nel liquido cerebrospinale (CSF) è in continua crescita. L'analisi di questi biomarcatori non solo potrebbe rivelarsi utile per la diagnosi precoce della malattia, ma fornirebbe anche informazioni fondamentali sui meccanismi patogenetici coinvolti. Inoltre, la misurazione dei livelli di biomarcatori sinaptici nel CSF potrebbe aiutare a delineare con maggiore precisione la prognosi dei pazienti con AD e monitorare la progressione della patologia. Questo approccio risulta particolarmente rilevante anche per l'analisi dell'efficacia di nuove terapie farmacologiche in fase di sperimentazione (Camporesi et al., 2020; Milà-Alomà et al., 2021).



**Figura 2.** Distribuzione dei biomarcatori sinaptici e neuronali emergenti. La maggior parte di questi biomarcatori si localizza a livello presinaptico, ad eccezione della neurogranina e delle pentrassine neuronali, che interessano la regione postsinaptica. Diversi di essi sono coinvolti nei processi di

*rilascio dei neurotrasmettitori e nell'assemblaggio delle vescicole sinaptiche: la sinaptotagmina-1 (SYT1), la sinaptofisina, la SNAP-25 e la SV2A svolgono un ruolo chiave in questi meccanismi. L' $\alpha$ -sinucleina ( $\alpha$ -syn) è prevalentemente citoplasmatica, ma può essere localizzata anche nei mitocondri e nelle vescicole sinaptiche. La proteina GAP-43 è altamente concentrata nel terminale presinaptico, dove contribuisce alla plasticità sinaptica e alla crescita neuronale. Abbreviazioni:  $\alpha$ -syn, sinucleina; DCV, vescicole a nucleo denso; GAP-43, proteina 43 associata alla crescita; LTP, potenziamento a lungo termine; NPTX, pentrassina neuronale; SNAP-25, proteina 25 associata ai sinaptosomi (Camporesi et al., 2020).*

Considerando che la sinaptopatia gioca un ruolo centrale nella patogenesi dell'AD, negli ultimi anni sono state analizzate diverse proteine pre- e post-sinaptiche misurabili nel CSF. Tra queste, particolare attenzione è stata rivolta alla famiglia delle sinucleine, che comprende  $\beta$ -sinucleina ( $\beta$ -syn),  $\alpha$ -sinucleina ( $\alpha$ -syn) e  $\gamma$ -sinucleina ( $\gamma$ -syn), alla neurogranina (Ng), alla synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25), alla sinaptotagmina-1, alla neuromodulina (GAP-43), alla synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A).

Di particolare interesse sono anche le pentrassine neuronali (NPTXs), coinvolte nella plasticità sinaptica e fortemente espresse nelle aree cerebrali colpite dall'AD e da altre malattie neurodegenerative (Gómez de San José et al., 2022). Questi biomarcatori potrebbero non solo riflettere i danni sinaptici, ma anche essere correlati ai cambiamenti metabolici cerebrali, come il consumo di glucosio e la disfunzione mitocondriale, che sono caratteristici dell'AD.

### 2.1.1 Pentrassina neuronale-2 (NPTX2)

La pentrassina neuronale-2 (NPTX2) è una proteina sinaptica appartenente alla famiglia delle pentrassine neuronali (NPTXs), che include anche la pentrassina neuronale-1 (NPTX1) e il recettore della pentrassina neuronale (NPTXR). Queste proteine svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi della plasticità sinaptica. Essendo presenti sia nella componente pre- sia in quella post-sinaptica, le NPTXs possono fornire informazioni dettagliate su entrambi questi compartimenti (Xu et al., 2003). Inoltre, la loro espressione è particolarmente elevata nelle regioni cerebrali maggiormente colpite dall'AD e da altre malattie neurodegenerative (Hawrylycz et al., 2012; Uhlén et al., 2015).

In particolare, NPTX2 è prevalentemente localizzata nelle sinapsi eccitatorie del sistema nervoso centrale, dove gioca un ruolo fondamentale nella formazione, nella maturazione e nella plasticità sinaptica, contribuendo così alla regolazione del funzionamento dei circuiti

neuronali. La sua partecipazione ai processi sinaptici la rende un elemento chiave per il corretto funzionamento cerebrale e ne suggerisce il potenziale come biomarcatore della disfunzione sinaptica nei disturbi neurodegenerativi, tra cui l'AD e la degenerazione lobare frontotemporale (Gómez de San José et al., 2022).

Inoltre, data la sua somiglianza strutturale con la più ampia famiglia delle pentrassine - proteine coinvolte nei meccanismi dell'immunità innata e nella regolazione della risposta infiammatoria attraverso l'attivazione del complemento (Z. Wang et al., 2020) - si può ipotizzare che NPTX2 abbia un ruolo anche nella neuroinfiammazione associata all'AD, nella rimozione dei detriti extracellulari e nella perdita sinaptica mediata dal complemento (Kovács et al., 2021; Swanson & Willette, 2016).

Tuttavia, le dinamiche e le variazioni dei livelli di NPTX2 nel CSF durante il decorso dell'AD non sono ancora del tutto chiarite, e i risultati degli studi condotti su campioni di CSF e tessuto cerebrale risultano contrastanti. Diverse analisi hanno mostrato una riduzione dei livelli di NPTX2 nel liquor di individui con MCI o demenza correlata all'AD rispetto ai controlli sani (Llano et al., 2023; Libiger et al., 2021; Sathe et al., 2021; Xiao et al., 2017; Nilsson et al., 2023). Inoltre, il calo dei livelli di NPTX2 nel liquor è risultato significativamente più marcato nei soggetti che progrediscono nella malattia rispetto a quelli che non mostrano un avanzamento della demenza (Libiger et al., 2021; Llano et al., 2023). D'altro canto, alcuni studi hanno evidenziato variazioni nell'espressione di NPTX2, con un aumento iniziale nelle fasi lievi-moderate della malattia, seguito da una riduzione negli stadi più avanzati dell'AD (Perna et al., 2021; Watson et al., 2023; Massa et al., 2024; Anderson et al., 2025; Oh et al., 2025).

Queste discrepanze possono derivare da differenze nel design degli studi, nella numerosità dei campioni, nello stadio della malattia analizzato e nelle metodologie utilizzate. Nonostante queste variazioni, i dati suggeriscono in modo coerente che i livelli di NPTX2 nel liquor subiscono modifiche dinamiche nel corso della patologia, sottolineando il suo potenziale come biomarcatore per monitorare la degenerazione sinaptica e il declino cognitivo nell'AD.

Studi recenti, come quello condotto da Massa (2024), hanno approfondito le dinamiche dei livelli di NPTX2 nel liquido cerebrospinale (CSF) e la loro relazione con i parametri del

metabolismo cerebrale regionale nei soggetti MCI-AD. In particolare, lo studio ha messo in evidenza una peculiare modulazione dei livelli liquorali di NPTX2 in due diversi stadi di MCI (early-MCI e late-MCI) ad eziologia Alzheimer, fornendo nuove evidenze a sostegno del ruolo fisiopatologico di questa proteina sinaptica nel continuum dell'AD. È stato osservato che i livelli di NPTX2 nel CSF erano significativamente più elevati nei soggetti con early-MCI rispetto sia a quelli con late-MCI, sia a un gruppo di controllo con altre patologie neurologiche (OND). Questo incremento nei soggetti nelle fasi iniziali potrebbe riflettere un meccanismo di compensazione sinaptica attivato in risposta agli insulti neurodegenerativi iniziali, un meccanismo che tuttavia sembra indebolirsi con l'avanzamento della malattia, come suggerito dalla successiva riduzione dei livelli di NPTX2 nei soggetti nelle fasi più avanzate di MCI, prossimi alla progressione a demenza.

In modo complementare, è stata dimostrata una correlazione tra i livelli di NPTX2 e la traiettoria cognitiva non solo nell'AD conclamato, ma anche in fase preclinica. Infatti, prendendo in esame pazienti che non mostravano deficit cognitivi all'inizio dello studio, livelli più bassi di NPTX2 sono risultati associati a un maggiore declino in un punteggio composito cognitivo globale, nei punteggi della memoria episodica e nelle funzioni esecutive. Questa correlazione tra NPTX2 e il declino cognitivo a lungo termine si verifica indipendentemente dai livelli basali di amiloide e p-tau (Anderson et al., 2025).

Un ulteriore aspetto rilevante emerso dallo studio di Massa et al. (2024) è la significativa correlazione positiva riscontrata tra i livelli di NPTX2 e il metabolismo del glucosio nel precuneo bilaterale, una regione cerebrale nota per essere coinvolta precocemente nei processi neurodegenerativi legati all'Alzheimer e fortemente associata al declino cognitivo. Questi risultati non solo confermano il potenziale valore di NPTX2 come biomarcatore precoce e sensibile della degenerazione sinaptica, ma mettono in luce anche una connessione funzionale tra l'attività sinaptica e il metabolismo cerebrale in regioni chiave dell'AD. Ciò rafforza ulteriormente l'ipotesi che NPTX2 possa rappresentare un indicatore dinamico della progressione patologica, utile sia per la diagnosi precoce sia per il monitoraggio dell'evoluzione della malattia nei suoi diversi stadi clinici.

### 2.1.2 Neurogranina (Ng)

Nel panorama dei biomarcatori emergenti per la malattia di Alzheimer (AD), crescente attenzione è rivolta anche a neurogranina (Ng).

La neurogranina (Ng) è una proteina post-sinaptica localizzata principalmente nelle spine dendritiche, dove modula la trasduzione del segnale attraverso la regolazione della calmodulina, risultando cruciale per la plasticità sinaptica e la memoria (Díez-Guerra, 2010) (Zhong et al., 2009). In particolare, è frequentemente situata in strutture granulari nelle cellule piramidali dell'ippocampo e della corteccia cerebrale, da cui deriva il suo nome di "neurogranina" (Represa et al., 1990). La sua espressione è dinamicamente regolata dall'attività sinaptica: aumenta in condizioni di stimolazione, e si riduce in presenza di disfunzione neuronale, come nel caso di un blocco a lungo termine dei recettori NMDAR (Garrido-García et al., 2019). Per quanto concerne il suo ruolo nella sinaptogenesi, è stato dimostrato che questa proteina aumenta la sensibilità postsinaptica e la forza sinaptica in modo dipendente dall'attività e dall'attivazione del recettore NMDAR. Questo potenziamento mediato da Ng mima e inibisce inoltre il potenziamento a lungo termine (LTP) (Zhong et al., 2009).

Visto il suo fondamentale coinvolgimento nella plasticità sinaptica, si possono facilmente comprendere le conseguenze mnesiche provocate da una sua alterazione nel liquor. La principale ripercussione di ciò consiste infatti in un declino cognitivo, che può essere indice sia di una condizione fisiologica come l'invecchiamento, sia di numerose condizioni patologiche. In merito al primo punto, i cambiamenti legati all'età della Ng post-sinaptica in specifiche aree cerebrali, e in particolare nell'ippocampo, potrebbero contribuire ad alterazioni delle vie di segnalazione  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina e a deficit specifici della plasticità sinaptica e al declino cognitivo in determinate regioni (Mons et al., 2001). Per quanto concerne invece il secondo punto, sono molte le evidenze che sostengono una correlazione tra la variazione dei livelli di Ng e malattie neurodegenerative e non: Alzheimer, Parkinson, demenza con corpi di Lewy, demenza frontotemporale, Creutzfeldt-Jakob, trauma cranico, ictus ischemico, neuro-HIV, neurosifilide, paralisi generale progressiva, schizofrenia (Xiang et al., 2020)

Numerosi studi hanno dimostrato che i livelli di Ng nel liquido cerebrospinale (CSF) sono significativamente aumentati nei pazienti con AD e MCI rispetto ai controlli sani (Thorsell et al., 2010; Portelius et al., 2018), con alcuni dati che suggeriscono una distinzione tra MCI e AD conclamato (Kester et al., 2015), sebbene non sempre confermati (Molinuevo et al., 2018).

Nell'Alzheimer si assiste infatti a un aumento dei livelli di Ng nel liquor, in parallelo a una loro diminuzione in specifiche aree cerebrali, ovvero corteccia e ippocampo (ciò è in linea con il suo ruolo nella sinaptogenesi). Questo è stato evidenziato dall'analisi di tessuti cerebrali post-mortem di pazienti affetti da AD (Blennow et al., 2019).

La Ng si è dimostrata utile anche nel predire il declino cognitivo e la progressione verso la demenza (Fyfe, 2015), risultando correlata a misure di atrofia cerebrale nei soggetti A $\beta$ -positivi (Molinuevo et al., 2018).

## **2.2 Biomarcatori di imaging**

### **2.2.1 Risonanza magnetica (RM)**

La RM consente di rilevare alterazioni morfologiche, come l'atrofia cerebrale, con particolare sensibilità per la riduzione volumetrica di aree coinvolte precocemente nel processo neurodegenerativo, quali l'ippocampo e la corteccia entorinale. Queste regioni, critiche per la memoria episodica, risultano tra le prime a essere colpite nei soggetti affetti da AD.

### **2.2.2 Tomografia ad emissione di positroni (PET)**

La tomografia ad emissione di positroni (i.e. Positron Emission Tomography, PET) è una tecnica di imaging medico-nucleare in grado di visualizzare *in vivo* sia l'attività metabolica dei tessuti sia la presenza di specifiche proteine patologiche. Essa si basa sull'uso di una sostanza radioattiva (detta *radiotracciante*) che viene iniettata a livello endovenoso e lega un particolare target di interesse per la quale ha un'affinità di legame selettiva. I composti organici marcati con radioisotopi utilizzati nell'esecuzione dell'esame sono in grado di emettere particelle di positroni che, incontrando gli elettroni dei tessuti, si annullano

generando due fotoni gamma, i quali vengono poi rilevati dal tomografo PET grazie ad una serie di sensori. In questo modo, è possibile ricostruire una mappa della distribuzione del radiotracciante nel tessuto di interesse.

Nell'ambito delle demenze neurodegenerative, a seconda del tracciante utilizzato, la PET è in grado di fornire informazioni diverse: l'uso della (F-18)2-fluoro-2-deossi-D-glucosio ( $^{18}\text{F}$ -FDG) PET permette una misura diretta dell'attività neuronale (Schöll et al., 2014), nonché della densità sinaptica (Mecca et al., 2020); l'utilizzo invece di traccianti per l'individuazione di aggregati di proteine anomale come l'A $\beta$  (Barthel & Sabri, 2017; Filippi et al., 2018) e la tau (Schöll et al., 2019), consente invece di evidenziare *in vivo* i principali processi neuropatologici, ovvero l'amiloidosi e la taupatia.

Infine, oltre a questi marcatori consolidati, sono in fase di sviluppo biomarcatori emergenti, mirati a rilevare la perdita sinaptica, un evento precoce e altamente correlato al declino cognitivo. La quantificazione di tali alterazioni rappresenta un obiettivo prioritario per migliorare la diagnosi precoce e monitorare in modo più accurato la progressione della malattia.

Tra le tecniche di neuroimaging, la [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET riveste un ruolo centrale per lo studio dell'attività metabolica cerebrale nell'iter diagnostico delle demenze neurodegenerative. Questo esame si basa sull'impiego di un analogo del glucosio marcato con fluoro-18, il 2-fluoro-2-deossi-D-glucosio, che, una volta somministrato, viene captato dai neuroni e fosforilato, ma non ulteriormente metabolizzato, rimanendo intrappolato nella cellula: questo peculiare meccanismo costituisce un eccellente mezzo per la misurazione del metabolismo glucidico *in vivo* (Phelps et al., 1979). La distribuzione del tracciante, riflettendo quindi l'attività metabolica del glucosio a livello cerebrale, è un indice indiretto del livello di attività neuronale e sinaptica (Schöll et al., 2014; Mecca et al., 2020). Questo deriva dal fatto che il maggior tasso di metabolismo glucidico lo troviamo soprattutto a livello dell'unità neurone-astrocita e nella sinapsi (Magistretti and Magistretti', 2000), rendendo la [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET uno strumento altamente sensibile per la funzionalità sinaptica.

Nel caso di un cervello adulto normale, la distribuzione dell'assorbimento di FDG non è uniforme ma è correlato a livello regionale alle diverse funzioni cerebrali e input sensoriali, con la corteccia cingolata posteriore (PCC), la corteccia visiva primaria (lobo occipitale

mediale) e lo striato che mostrano un assorbimento relativamente più elevato rispetto ad altre regioni corticali (Thientunyakit et al., 2025)

Nel caso invece dei disturbi neurodegenerativi, l'alterata captazione regionale di FDG aiuta ad identificare le aree di disfunzione neuronale, mostrando una correlazione con i sintomi cognitivi e comportamentali del paziente (Thientunyakit et al., 2025).

L'ipometabolismo nella data area di interesse è quindi interpretabile come indice di danno neuronale, riduzione della densità del neuropilo e disfunzione o perdita di integrità sinaptica (Herholz et al., 2002; Zimmer et al., 2017), ma anche di deafferentazione di quell'area rispetto ad un'altra funzionalmente connessa ad essa (fenomeno che viene definito "diaschisi") (Provost et al., 2021) (Nakashima et al., 2007).

Possiamo quindi concludere che l' $^{18}\text{F}$ FDG PET, consentendo di stimare neurodegenerazione e disfunzione sinaptica, è raccomandata per la diagnosi precoce nei pazienti con sospetto di AD (Garibotto et al., 2017; Nobili, Arbizu, et al., 2018), differenziandolo da altre forme di demenza, come quella frontotemporale o la DLB (Marcus et al., 2014).

### 2.2.3 Caratteristiche della [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET nell'AD

L'analisi delle diverse distribuzioni del metabolismo cerebrale può offrire importanti informazioni sulla natura e sulla gravità di molte patologie, comprese le demenze. Nel caso specifico dell'AD, l'osservazione dei pattern metabolici rappresenta un importante strumento per comprendere meglio la malattia: studi recenti hanno dimostrato che le regioni cerebrali più colpite dalla riduzione del metabolismo sono quelle temporo-parietali, le quali comprendono il cingolato posteriore (PCC), il precuneo (PC) e l'area del giro angolare (Bohnen et al., 2012). Questo ipometabolismo si dimostra generalmente bilaterale, seppur con evidente asimmetria.

Tuttavia, è interessante notare come nella regione temporale mesiale, che comprende l'ippocampo, la corteccia entorinale e l'amigdala, nonostante questa rappresenti l'area primariamente colpita dal punto di vista del processo neurodegenerativo, l'ipometabolismo risulti meno marcato alla [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET rispetto alle alterazioni morfologiche osservabili con la risonanza magnetica.

Questo risiede nel fatto che, non solo vi è una naturale variabilità del volume di tali strutture nei diversi individui, ma in queste regioni è presente, peraltro, un metabolismo basale inferiore rispetto ad altre aree cerebrali. Tuttavia, è stato dimostrato che il metabolismo glucidico ippocampale può avere un ruolo rilevante nel distinguere i soggetti con Mild Cognitive Impairment (MCI) da quelli con invecchiamento fisiologico (Bohnen et al., 2012), così come alterazioni del metabolismo a livello della corteccia entorinale sono in grado di predire il declino verso l'MCI (Mosconi, 2005).

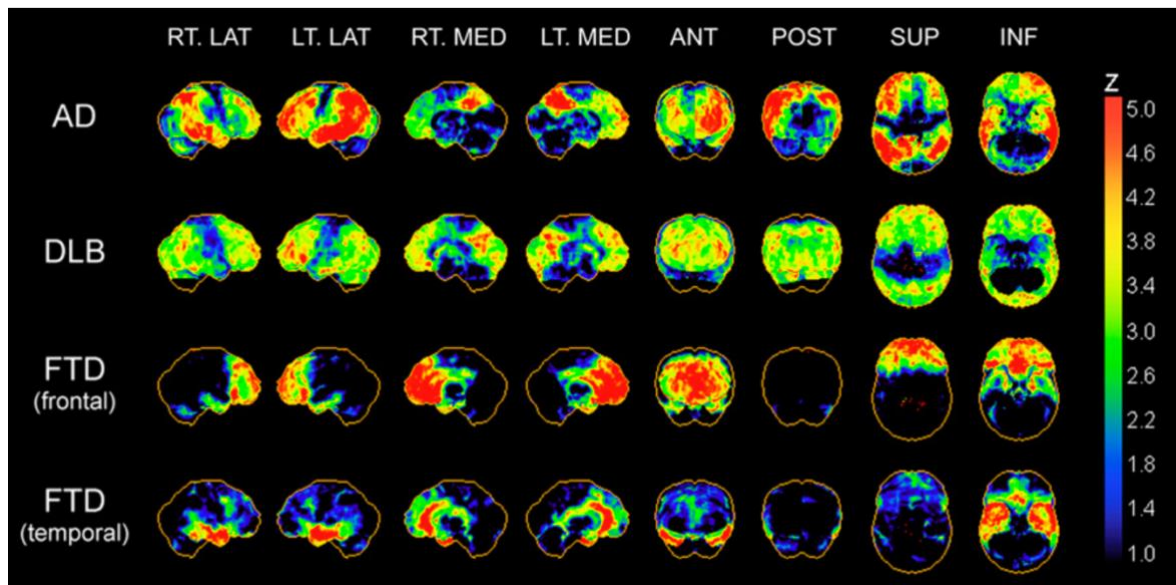
Ciò nonostante, il più accurato e precoce indicatore di AD rimane l'ipometabolismo del cingolo posteriore (PCC), e la sua eventuale estensione al precuneo (PC) (Morbelli, Garibotto, et al., 2015). A sostegno di ciò vi è il fatto che tale pattern di ipometabolismo è anche riscontrabile in quei pazienti clinicamente asintomatici ma con predisposizione genetica per lo sviluppo di AD (Protas et al., 2013). Inoltre, è stato dimostrato come questo pattern ipometabolico sia espressione di una disconnessione funzionale con l'ippocampo (Provost et al., 2021) (Nakashima et al., 2007).

Il riscontro di questo specifico pattern di ipometabolismo risulta particolarmente utile per la diagnostica differenziale con altre patologie neurodegenerative. Ad esempio, nella demenza a corpi di Lewy (DLB) possiamo riscontrare una caratteristica riduzione metabolica nella corteccia occipitale mediale (Minoshima et al., 2001), con una relativa preservazione del cingolato posteriore, fenomeno noto come “segno dell'isola del cingolo” (Minoshima et al., 2001). Per quanto riguarda invece la demenza frontotemporale (FTD), questa è facilmente identificabile per le tipiche alterazioni metaboliche frontali o frontotemporali, di solito asimmetriche, da dove possono poi estendersi ad altre aree di associazione (Diehl-Schmid et al., 2007) (Figura 3).

Inoltre, grazie alla sensibilità per alterazioni metaboliche cerebrali e l'elevato valore predittivo negativo, un risultato normale della [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET rende improbabile una patologia degenerativa in un soggetto con disturbo cognitivo conclamato (Bohnen et al., 2012).

Il valore della [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET nella diagnosi di AD è stata valutata da molti studi, molti dei quali sono stati inclusi in una metanalisi che ne ha dimostrato un'accuratezza diagnostica

maggiore rispetto agli altri metodi diagnostici disponibili, come le linee guida cliniche, MRI, CT, SPECT, e i biomarkers. (Marcus et al., 2014)



**Figura 3.** Pattern regionali tipici di ipometabolismo cerebrale alla  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  PET in AD, DLB e FTD frontale e temporale. In base ai voxel gravemente ipometabolici rispetto al gruppo di confronto non-demente, i modelli sono visualizzati come mappe di z-score. Nell'AD le regioni maggiormente ipometaboliche sono le cortecce associative temporoparietali, il cingolo posteriore e il precuneo.. La DLB presenta un ipometabolismo corticale simile a quello dell'AD, ma con peculiare coinvolgimento della corteccia occipitale. La FTD è caratterizzata da un ipometabolismo prevalente nelle cortecce frontali e/o temporali, con un relativo risparmio della corteccia associativa parietale e conservazione delle cortecce somatomotorie e visive primarie (Bohnen et al., 2012).

#### 2.2.4 Analisi Semiquantitativa e Automatica della $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET

Per l'interpretazione delle scansioni derivanti dalla PET viene tipicamente utilizzata una valutazione visiva soggettiva qualitativa, con una variabilità dipendente dall'esperienza dell'operatore. Tuttavia, dal momento che nelle fasi prodromiche del decadimento cognitivo le alterazioni metaboliche sono molto lievi e difficilmente rilevabili (Massa, Chincari, et al., 2022; Morbelli, Brugnolo, et al., 2015), sono stati sviluppati dei metodi automatizzati di semi-quantificazione con lo scopo di aumentare l'accuratezza diagnostica e diminuire la variabilità data dalla perizia dell'operatore (Nobili, Festari, et al., 2018). In particolare, tali strumenti sono costituiti essenzialmente da dei software, i quali presentano diverse caratteristiche a seconda della regione di riferimento utilizzata per la normalizzazione, del metodo utilizzato per l'analisi (sia esso basato sui voxel o sui volumi di interesse), della

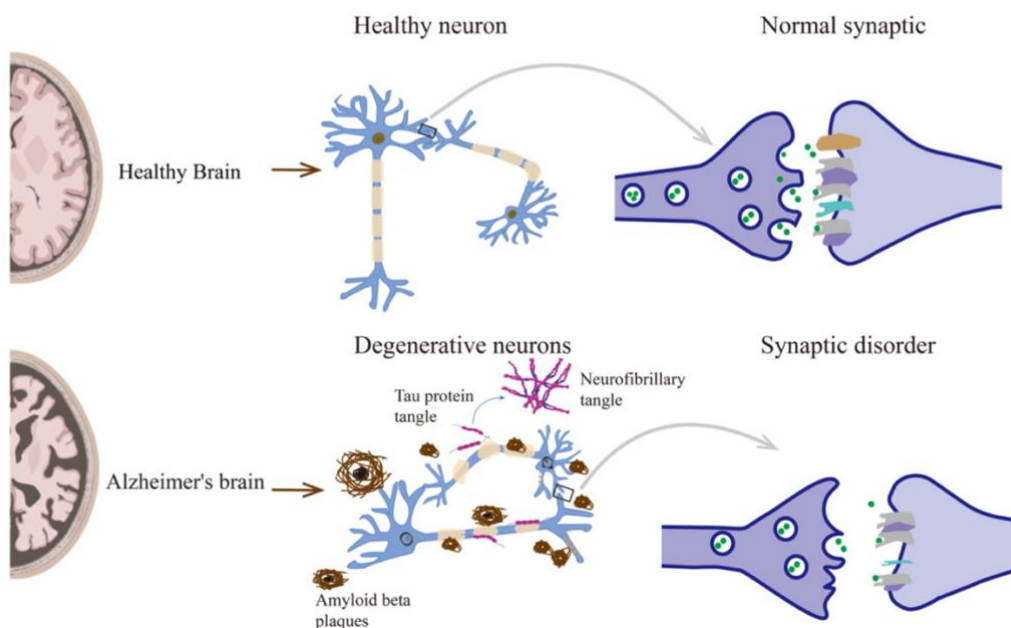
strutturazione del gruppo di controllo e della soglia di significatività statistica. Si basano sul principio di confrontare l'immagine PET di un soggetto (analisi single-subject) o un gruppo di soggetti (group-analysis) rispetto a quella di uno o più gruppi di controllo.

A tal proposito è possibile utilizzare due tecniche differenti: l'analisi voxel-based (VBA) consente di identificare differenze statisticamente significative nel metabolismo glucidico di ogni singolo voxel, basandosi su una soglia preimpostata, generando mappe parametriche (Perani et al., 2014). L'approccio VOI-based, invece, si concentra su volumi di interesse (i.e. volumes of interest, VOI) costituiti da gruppi di voxel adiacenti che siano statisticamente significativi, e normalizza i valori medi di densità metabolica rispetto a regioni cerebrali di riferimento prestabilite, come l'intero cervello (whole brain, WB) o aree specifiche generalmente risparmiate dalla patologia, come il cervelletto o il ponte. Queste metodologie non solo aumentano la sensibilità dell'indagine, ma permettono anche di correlare i pattern metabolici con altre variabili quantitative, siano esse cliniche, cognitive o biologiche (Nobili, Festari, et al., 2018).

Nel complesso, la [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET costituisce uno dei biomarcatori funzionali più efficaci per l'AD, grazie alla sua elevata sensibilità e alla sua utilità nella diagnostica differenziale nell'ambito di patologie neurodegenerative. La prospettiva per il futuro è di raggiungere una diagnosi biologica sempre più accurata e personalizzata, soprattutto attraverso la sua integrazione con altri marcatori di neuroimaging e con biomarcatori fluidi.

### 3. Il concetto di AD come sinaptopatia

Nella patogenesi del processo neurodegenerativo dell'AD un ruolo cruciale è svolto dalla disfunzione sinaptica, in particolare nelle fasi prodromiche della malattia (Chen et al., 2022) (Figura 4). Le sinapsi cerebrali, grazie alla loro intricata rete di connessioni neurali, rappresentano le unità fondamentali per il trasferimento delle informazioni tra i neuroni, rendendo possibile la comunicazione neurone-neurone, essenziale per l'apprendimento, la memoria e le funzioni cognitive. Questo avviene attraverso il rilascio e il riconoscimento di neurotrasmettitori specifici ai terminali pre- e post-sinaptici, facilitando non solo la trasmissione dei segnali, ma anche l'immagazzinamento delle informazioni, essenziale per la formazione della memoria e l'apprendimento (Südhof, 2018). Per il corretto funzionamento sinaptico, e quindi per una funzionalità neurale ottimale, è fondamentale mantenere un equilibrio fisiologico tra la formazione e la rimozione delle sinapsi stesse.



**Figura 4.** L'aggregazione anomala di amiloide-beta ( $A\beta$ ), tau e altre proteine contribuisce alla disfunzione sinaptica nell'Alzheimer: l'accumulo di queste proteine alterate provoca modifiche nei recettori della membrana postsinaptica, compromette la plasticità sinaptica e causa cambiamenti nella morfologia e densità delle spine dendritiche, che infine portano a una riduzione complessiva del numero di sinapsi cerebrali (Chen et al., 2022).

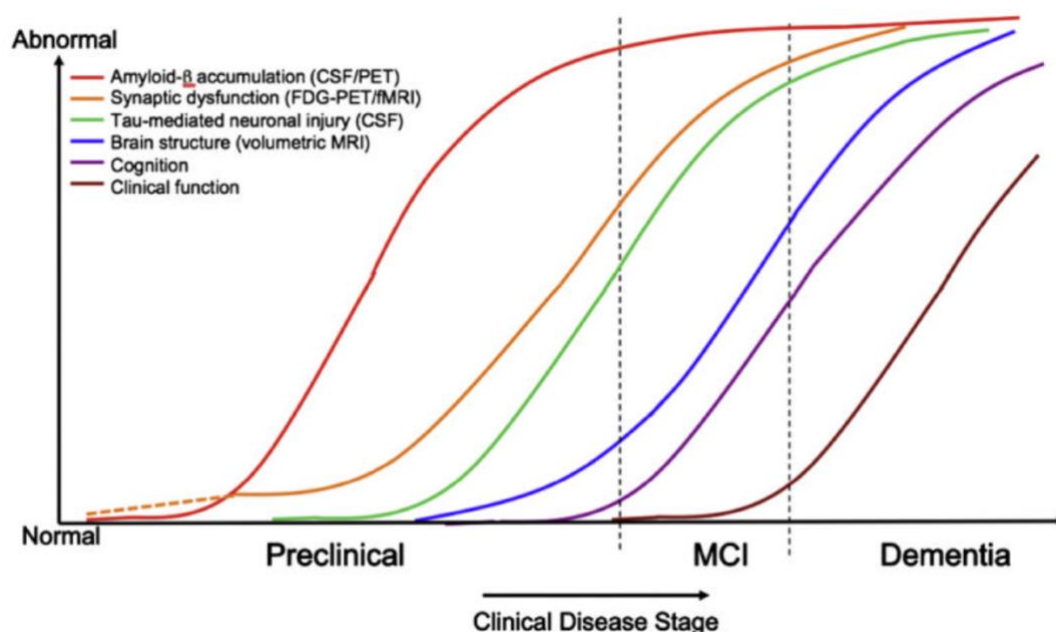
Numerosi studi hanno definito la disfunzione sinaptica come il fattore neuropatologico maggiormente correlato al declino cognitivo osservato nei pazienti con AD, persino in misura maggiore rispetto all'accumulo di placche amiloidi o grovigli neurofibrillari,

ponendola quindi al centro dei processi patologici precoci (Camporesi et al., 2020; Oddo et al., 2003).

Un'ulteriore prova a sostegno dell'importanza della preservazione dell'integrità di rete, anche al di fuori delle malattie neurodegenerative, è legata al suo coinvolgimento nel sano invecchiamento cognitivo. Quest'ultimo, infatti, è caratterizzato da un'elevata variabilità interindividuale, da cui ne consegue il mantenimento o meno della capacità di apprendimento nella popolazione anziana. In merito a ciò, la precoce vulnerabilità del lobo temporale mediale ne è un esempio, dal momento che la compromissione della sua integrità comporta il coinvolgimento della memoria episodica e della navigazione spaziale. Pertanto, numerose evidenze suggeriscono che il declino cognitivo sia più strettamente correlato a alterazioni nella regolazione di rete e nella plasticità sinaptica, processi coinvolti nella resilienza cognitiva, che a una perdita neurale (Abrous et al., 2026).

Nell'ambito delle patologie neurodegenerative, la perdita tra le diverse sottopopolazioni sinaptiche non è tuttavia uniforme. Infatti, numerosi studi su tessuto cerebrale post-mortem di pazienti affetti da Alzheimer, hanno mostrato una correlazione negativa tra la perdita di sinapsi e le loro dimensioni, con le sinapsi rimanenti che sembrano essere più grandi all'aumentare della perdita sinaptica (Meftah & Gan, 2023).

Sperling et al. (2011) hanno elaborato un modello teorico, con il quale è stato messo in luce come le alterazioni a livello sinaptico costituiscano uno degli eventi iniziali più rilevanti nella progressione dell'AD: in esso viene descritta una sequenza temporale in cui i biomarcatori più significativi dell'AD - tra cui l'accumulo di beta-amiloide, le alterazioni della proteina tau e la disfunzione sinaptica - subiscono variazioni progressive e ordinate. Secondo questo modello, tali cambiamenti non avvengono casualmente, ma seguono un decorso sistematico che porta ciascun biomarcatore a raggiungere un livello di stabilizzazione, noto come plateau (Figura 5).



**Figura 5.** Modello che descrive l'evoluzione dei biomarcatori nell'AD, con un'estensione per includere la fase preclinica. Il processo inizia con l'accumulo di  $A\beta$ , rilevabile attraverso la misurazione dell' $A\beta_{42}$  nel liquido cerebrospinale (CSF) o mediante imaging PET per l'amiloide. La disfunzione sinaptica viene individuata tramite PET con  $[^{18}F]FDG$  o risonanza magnetica funzionale (fMRI), rappresentata con una linea tratteggiata per indicare che nei portatori dell'allele  $\epsilon 4$  del gene *APOE* potrebbe manifestarsi prima della deposizione rilevabile di  $A\beta$ . Il danno neuronale è evidenziato dalla presenza di tau o fosfo-tau nel CSF, mentre l'atrofia cerebrale viene osservata attraverso la risonanza magnetica strutturale. I biomarcatori attraversano una progressione che li porta da valori normali a livelli massimamente alterati (asse y) in relazione allo stadio della malattia (asse x). Inoltre, sono rappresentate le traiettorie temporali di due parametri fondamentali per la classificazione clinica della malattia: le funzioni cognitive e comportamentali, oltre alla funzionalità clinica (Sperling et al., 2011).

Di conseguenza, l'AD, tradizionalmente descritta come una “proteinopatia” a causa dell'accumulo di placche amiloidi senili extracellulari e grovigli neurofibrillari (NFTs) intraneuronali, è stata recentemente ridefinita anche come una “sinaptopatia”. Questo termine risulta particolarmente adatto a descrivere le patologie caratterizzate da una progressiva compromissione e perdita delle sinapsi.

Un elemento centrale nel processo neurodegenerativo della malattia di Alzheimer è rappresentato dalle alterazioni della neurotrasmissione glutammatergica, le quali sembrano svolgere un ruolo cruciale soprattutto nelle fasi precoci e nel successivo sviluppo della patologia.

Parallelamente, anche la proteina tau iperfosforilata (p-Tau), in forma oligomerica, contribuisce in modo significativo alla disfunzione sinaptica. In condizioni patologiche, gli

oligomeri di p-Tau si redistribuiscono dagli assoni, dove normalmente risiedono, verso i compartimenti dendritici. In queste nuove sedi, p-Tau interferisce direttamente con i recettori del glutammato, sia NMDAR che AMPAR ( $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolopropionico), perturbando ulteriormente la trasmissione sinaptica e contribuendo al deterioramento cognitivo.

Un ulteriore meccanismo che accentua la degenerazione sinaptica è legato alla risposta infiammatoria mediata dalla microglia, le cellule immunitarie residenti del sistema nervoso centrale. Questa viene attivata dagli oligomeri di A $\beta$ , che quindi non si limitano ad esercitare un'azione neurotossica diretta, ma anzi promuovono addirittura il reclutamento delle cellule immunitarie nei pressi delle placche amiloidi. Questa attivazione determina l'upregolazione di molecole del sistema del complemento, tra cui la proteina C3, che agisce da segnale di "marcatura" per le sinapsi. Di conseguenza, le terminazioni sinaptiche vengono erroneamente riconosciute come elementi da eliminare e vanno incontro a fagocitosi da parte della microglia, con una conseguente compromissione della funzionalità sinaptica e della comunicazione neuronale (Rajendran & Paolicelli, 2018).

In ambito di ricerca sull'AD, un aspetto di crescente interesse riguarda il potenziale ruolo delle sinapsi nella propagazione stessa della patologia. Infatti, essendo nodi fondamentali per la comunicazione intercellulare, le sinapsi potrebbero rappresentare anche canali preferenziali per la diffusione delle proteine tossiche implicate nella malattia. In merito a ciò, alcune evidenze sperimentali supportano l'ipotesi secondo cui sia possibile il trasferimento di oligomeri di A $\beta$  e tau da un neurone all'altro attraverso meccanismi di tipo prionico, cioè tramite un processo di diffusione intersinaptica che comporta una trasmissione diretta di proteine mal ripiegate. Questo meccanismo, oltre a spiegare la progressione topografica della neurodegenerazione osservata nell'AD, apre nuove prospettive sul ruolo delle sinapsi non solo come bersagli, ma anche come veicoli attivi della patologia (Camporesi et al., 2020).

## 4. Scopo del lavoro

Nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD) un ruolo fondamentale viene dunque rivestito precocemente dalla sinaptopatia, la quale ha un importante risvolto clinico dal momento che è direttamente correlata al declino cognitivo caratteristico di questa patologia. La malattia di Alzheimer viene sempre maggiormente definita attraverso biomarcatori *in vivo*, con  $\beta$ -amiloide e tau che forniscono una base biologicamente fondata per la diagnosi e la stadiazione della patologia AD lungo l'intero spettro clinico, dal lieve deterioramento cognitivo (MCI) alla demenza (Albert et al., 2011; Jack Jr. et al., 2024). Tuttavia, anche all'interno del MCI-AD confermato da biomarcatori, le traiettorie cliniche divergono in modo sostanziale. Infatti, alcuni pazienti progrediscono rapidamente verso la demenza, mentre altri rimangono stabili o progrediscono lentamente per diversi anni, nonostante siano sottesi da profili amiloide-tau simili (Duara & Barker, 2022). Questa variabilità comporta una serie di implicazioni per il counseling, l'arricchimento dei trial e la scelta e la tempistica degli interventi modificanti la malattia. È probabilmente spiegata da una serie di fattori complementari, come la diversità strutturale e di diffusione della proteina tau, la presenza di co-patologia, così come da differenze interindividuali nella resilienza e vulnerabilità alla patologia AD (Dujardin et al., 2020; Jagust et al., 2023; Jack Jr. et al., 2024; Mendes et al., 2025).

I modelli di riserva, vulnerabilità e resilienza sottolineano il fatto che le differenze interindividuali possano essere dovute all'efficienza delle reti, alla ridondanza, alla plasticità, alla connettività e alla capacità di reclutare vie alternative, motivo per cui un carico patologico comparabile può corrispondere a esiti cognitivi differenti (Schultz et al., 2017; Corriveau-Lecavalier et al., 2024; Pini et al., 2026). La progressione clinica può quindi essere interpretata come una transizione da una fase di compensazione di rete, in cui il deficit cognitivo resta clinicamente silente, a una di fallimento, in cui invece esso diventa manifesto. Nelle fasi iniziali, infatti, i networks cerebrali possono compensare la patologia crescente attraverso una iper-segnalazione e un aumento di connettività, mantenendo la performance cognitiva nonostante il danno biologico sottostante. Con il passare del tempo, però, questi meccanismi possono diventare insufficienti, portando a un declino accelerato in molteplici aree e alla progressione verso la demenza (Jones et al., 2016; Pini et al., 2026).

Se le traiettorie cliniche dipendono dall'integrità dei circuiti a valle e dalla capacità adattativa, allora i soli marcatori *core* potrebbero essere insufficienti a spiegare l'eterogeneità nel MCI-AD (Jack Jr. et al., 2024). Questo limite ha alimentato l'interesse per biomarcatori più vicini al substrato biologico della capacità cognitiva, quali quelli informativi circa la disfunzione sinaptica, ampiamente riconosciuta come un processo precoce (Sperling et al., 2011) e, fortemente correlata al deficit cognitivo, consente di definire il concetto di AD come un "fallimento sinaptico" (Selkoe, 2002). Di conseguenza, le proteine sinaptiche nel liquor cerebrospinale (CSF) si sono dimostrate i markers ideali che meglio riflettono lo stato delle reti neurali "a valle", potenzialmente in grado di fornire informazioni complementari e additive a quelle già fornite da amiloide e tau (Camporesi et al., 2020; Milà-Alomà et al., 2021).

È importante sottolineare che i biomarcatori sinaptici non costituiscono una singola classe intercambiabile. Diverse proteine corrispondono a distinti compartimenti sinaptici (pre- vs post-sinaptici) e processi biologici, e possono quindi essere indice di differenti aspetti della sinaptopatia (Camporesi et al., 2020). La Neurogranina (Ng) nel CSF è tra i biomarcatori più conosciuti ed è generalmente interpretata come marcatore dendritico di danno post-sinaptico, con un aumento relativamente specifico nell'AD (Portelius et al., 2015; Wellington et al., 2016). In studi proteomici su larga scala, Ng (insieme ad altre proteine associate al danno sinaptico come SNAP-25) è risultata aumentata lungo l'intero continuum dell'AD e ha mostrato una forte capacità discriminativa diagnostica, coerente con l'idea che Ng rifletta bene una dimensione dominata dal danno nella patologia sinaptica (Nilsson et al., 2024).

Tuttavia, una dimensione basata esclusivamente sul danno è piuttosto limitante, dal momento che difficilmente riuscirebbe a cogliere i principali determinanti della progressione clinica. Infatti, pazienti con danno sinaptico comparabile possono differire nella capacità adattativa residua a livello sinaptico e di rete, che contribuisce a stabilizzare il funzionamento dei circuiti. Questo è biologicamente possibile perché i neuroni possono attivare meccanismi locali di plasticità sinaptica compensatoria in risposta alla perdita di sinapsi (ad esempio attraverso l'ingrandimento delle spine dendritiche residue e/o il rimodellamento), sebbene l'entità e il beneficio clinico di tale compensazione varino notevolmente tra individui (Bhembre et al., 2023). Il risultato che ne consegue è la presenza di traiettorie cliniche distinte a partire da uno stesso burden di danno sinaptico.

Neuropentrassina 2 (NPTX2) rappresenta un candidato eccellente per catturare questa dimensione complementare, dato il suo ruolo nella regolazione omeostatica della dinamicità delle reti corticali e della plasticità sinaptica (Gómez de San José et al., 2022). NPTX2 nel CSF è ridotta nella demenza da AD e mostra una stretta correlazione con la performance cognitiva e il volume ippocampale, oltre che con un maggiore rischio di progressione dall' MCI in molteplici coorti (Xiao et al., 2017; Galasko et al., 2019; Nilsson et al., 2021; Sathe et al., 2021; Libiger et al., 2021; Llano et al., 2023). Inoltre, in soggetti cognitivamente indenni, livelli più bassi di NPTX2 nel CSF sono stati associati a un rischio maggiore di sviluppare MCI indipendentemente dai livelli dei biomarcatori *core* dell'AD nel CSF (Soldan et al., 2023).

In modo complementare, nell'AD preclinico, livelli basali più elevati di NPTX2 erano associati a un declino cognitivo a lungo termine più lento, anche tenendo conto di amiloide e tau (Anderson et al., 2025). Inoltre, in un'ampia coorte a rischio, livelli più alti di NPTX2 nel CSF sono stati associati a un declino cognitivo più lento anche dopo correzione per il carico amiloide, mentre i marcatori classici di danno sinaptico mostravano il pattern opposto, sostenendo ulteriormente l'idea che NPTX2 catturi una dimensione distinta dal danno sinaptico e più vicina alla resilienza cognitiva (Planalp et al., 2025).

Queste evidenze giustificano biologicamente l'utilizzo di NPTX2 come un marker indiretto dell'integrità sinaptica e di rete, piuttosto che semplicemente di danno sinaptico. Questa proteina liquorale, infatti, è anch'essa correlata alla sinaptopatia, ma a differenza di Ng consente di apprezzarne una sfaccettatura maggiormente legata all'omeostasi e alla risposta adattiva di rete.

Recenti studi proteomici su larga scala suggeriscono inoltre che firme proteiche sinaptiche, inclusi patterns correlati a NPTX2, catturino una dimensione biologica di resilienza cognitiva non completamente spiegata dal carico di amiloide o tau (Oh et al., 2025). Infine, nello studio BioFINDER-2, combinando diverse dimensioni tramite rapporti tra proteine aumentate nell'AD (ad esempio SNAP-25 o 14-3-3 $\zeta/\delta$  e neurogranina) e NPTX2, è stata rafforzata la correlazione tra declino cognitivo e atrofia cerebrale (Nilsson et al., 2024). Questa prospettiva è in linea con l'idea che la traiettoria clinica possa essere meglio rappresentata dalla combinazione di marcatori di danno sinaptico e processi di rete correlati a NPTX2.

Nel complesso, queste osservazioni supportano un'ipotesi specifica e verificabile nel MCI-AD. I pattern delle proteine sinaptiche potrebbero rivelare sottogruppi clinicamente significativi con traiettorie di progressione distinte, riflettendo differenze interindividuali nella vulnerabilità delle reti cerebrali a valle rispetto alla capacità cognitiva preservata. In questa ipotesi, livelli sproporzionatamente bassi di NPTX2 nel CSF nel contesto di danno sinaptico e patologia AD potrebbero segnalare una ridotta capacità di mantenere l'omeostasi di rete dipendente dall'attività e, quindi, una maggiore probabilità di progressione clinica a breve-medio termine. Viceversa, livelli relativamente preservati o aumentati di NPTX2 nel CSF potrebbero indicare una maggiore integrità sinaptica/di rete e stabilità cognitiva prolungata.

Una sfida cruciale è tradurre questa idea in una metrica interpretabile limitando allo stesso tempo la ridondanza tra marcatori sinaptici correlati. Poiché NPTX2 e Ng sono entrambe proteine sinaptiche, è attesa una certa correlazione; tuttavia, il loro peso relativo potrebbe fornire informazioni rilevanti a livello prognostico. Gli approcci basati su rapporti costituiscono un primo passo utile, ma mescolano intrinsecamente gli effetti di numeratore e denominatore, limitando potenzialmente l'interpretabilità meccanicistica (Tu et al., 2010). Una strategia alternativa e complementare consiste nell'interpretare NPTX2 nel CSF rispetto al suo livello atteso dato il danno sinaptico e la patologia *core* dell'AD, concentrandosi quindi sul fatto che NPTX2 sia più basso o più alto del previsto in quel contesto biologico.

In questo studio testiamo questa ipotesi in una coorte di pazienti con MCI-AD tipico, definiti secondo criteri basati su biomarcatori nel CSF e seguiti longitudinalmente per gli esiti clinici (Albert et al., 2011; Jack Jr. et al., 2024). Abbiamo considerato la Ng nel CSF come marcatore di danno sinaptico e ci siamo chiesti se uno specifico segnale di CSF NPTX2 - interpretato nel contesto del danno sinaptico e del carico amiloide-tau - fornisca informazioni prognostiche incrementalmente per il declino cognitivo. Questa componente di "NPTX2 oltre il danno/la patologia" potrebbe rappresentare un proxy operativo di resilienza sinaptica o capacità adattativa di rete, contribuendo a chiarire il significato biologico e clinico della variabilità dei livelli di proteine sinaptiche nel CSF lungo lo spettro MCI-AD, oltre che l'eterogeneità clinica nelle fasi prodromiche. Ci siamo quindi posti l'obiettivo di isolare questa componente residuale di NPTX2 caratterizzata da un significato ortogonale a Ng, in modo tale da ottenere una metrica statistica correlabile all'outcome clinico e che abbia un

suo peso dal punto di vista prognostico, giustificando le diverse traiettorie cliniche a cui possono andare incontro pazienti con un livello di danno sinaptico comparabile (che viene più specificatamente espresso dalla Neurogranina). Inoltre, studiandone il correlato metabolico utilizzando metriche derivate da scansioni di [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET cerebrale, ci poniamo l'obiettivo di comprendere se ci sia una differenza tra NPTX2 in quanto tale e questa metrica statistica residuale, al fine di valutare il segnale specifico di NPTX2 più prossimo al concetto di resilienza e di omeostasi sinaptica.

## 5. Metodi

### 5.1 Pazienti

Abbiamo selezionato retrospettivamente 104 pazienti (di cui 42 donne) affetti con alta probabilità da un Mild Cognitive Impairment (MCI) tipico dovuto a malattia di Alzheimer da un database clinico costituito da 300 pazienti consecutivi, diagnosticati come affetti da MCI-AD presso la Memory Clinic dell'Università di Genova (Italia), tra maggio 2017 e gennaio 2025, secondo gli attuali criteri NIA-AA (Albert et al., 2011). La coorte presentava un'età media di  $72.6 \pm 6.9$  anni (range tra 52.4-84.3 anni), scolarità di  $10.8 \pm 4.4$  anni (range tra 5-23 anni), e MMSE al baseline di  $26.1 \pm 2.6$  (range tra 19-30). Alla prima valutazione i partecipanti hanno eseguito una visita neurologica e medica generale, oltre a una batteria neuropsicologica estesa, come descritto in precedenza (Massa et al., 2022), documentando un profilo amnestico (mono- o multi-dominio). Le attività di base e strumentali della vita quotidiana erano preservate in tutti i casi, come confermato dal colloquio clinico e da questionari standardizzati. Il Clinical Dementia Rating (CDR) era costantemente pari a 0.5, supportando una diagnosi finale di MCI amnestico (Petersen et al., 2014). Per escludere le altre cause di compromissione cognitiva sono stati eseguiti gli esami ematici di routine e la risonanza magnetica cerebrale. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che presentavano un severo burden di iperintensità della sostanza bianca alla risonanza magnetica (corrispondente allo stadio 3 di Fazekas). Tutti i partecipanti sono stati inoltre sottoposti ad una puntura lombare per la determinazione dei biomarcatori liquorali *core* dell'AD (ovvero il rapporto amiloide- $\beta$ 42/amiloide- $\beta$ 40 [ $A\beta$ 42/ $A\beta$ 40]; la tau fosforilata sulla treonina 181 [p-Tau181]; e la tau totale [t-Tau]). Era presente un profilo AT(N) compatibile con AD in 98 pazienti e un profilo A+T- per cambiamenti patologici di Alzheimer in 6 pazienti (Jack et al., 2018). Per essere inclusi nello studio, tutti i pazienti avevano inoltre eseguito una [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET entro due mesi dal baseline, che mostrava un pattern ipometabolico tipico dell'AD (Nobili et al., 2018). La positività della [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET ha consentito anche la conferma di AD nei 6 pazienti A+T-, in accordo con quanto è raccomandato in questo specifico percorso diagnostico (Frisoni et al., 2024). A sostegno della conferma diagnostica era poi richiesto un follow-up clinico minimo di un anno.

Durante l'intero periodo di follow-up ( $3.3 \pm 2.1$  anni; range 1-11 anni), 55 pazienti sono progrediti a demenza dopo  $2.9 \pm 1.9$  anni. La progressione a demenza è stata definita da un punteggio CDR=1 basato su interviste strutturate con pazienti e caregiver. Usando una soglia di 2 anni, abbiamo stratificato l'MCI-AD in due sottogruppi. A differenza degli approcci ADNI, che classificavano early/late MCI in base alla severità del deficit mnemonico (Aisen et al., 2010; Edmonds et al., 2019), abbiamo adottato un criterio temporale che riflette la prossimità alla demenza, in linea con i nostri lavori precedenti (Massa et al., 2024; Massa et al., 2022). Il late MCI (LMCI, n=30) è stato definito dalla progressione a demenza entro 2 anni dal baseline ( $1.5 \pm 0.4$  anni), mentre l'early MCI (EMCI, n=74) includeva soggetti che progredivano dopo 2 anni dal baseline o rimanevano stabili allo stadio di MCI durante l'osservazione.

## 5.2 Misure dei biomarcatori liquorali

Il campionamento e la gestione pre-analitica del liquor sono stati eseguiti seguendo procedure operative standard (Teunissen et al., 2009). In particolare, i campioni del liquido cerebrospinale (CSF) (6-8 ml) sono stati ottenuti mediante puntura lombare a livello degli spazi intervertebrali L3-L4 o L4-L5 nel mattino presto. Sono stati raccolti in provette sterili in polipropilene e centrifugati a 4000 g per 10 minuti a 4°C, per poi essere aliquotati in provette di propilene e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi, così da garantire la stabilità a lungo termine delle proteine.

Abbiamo misurato i biomarcatori liquorali *core* dell'AD ( $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{40}$ , p-Tau181, e t-Tau) usando la piattaforma completamente automatizzata Lumipulse G600 II®, basata sull'immunoassay con metodica di chemiluminescenza (Fujirebio Europe, Ghent, Belgium). I cutoff delle cartucce del produttore sono stati verificati localmente nel nostro laboratorio:  $A\beta_{42}/40 = 0.069$ , pTau181 = 56.5 pg/mL, e t-Tau = 404 pg/mL (Massa et al. 2022, 2024). Sulle stesse aliquote liquorali sono stati quantificate CSF NPTX2 e neurogranin (Ng, trunc P75) mediante i kits ELISA commercialmente disponibili (rispettivamente INNOTEST, Fujirebio Europe, Ghent, Belgio; and Euroimmun, Lübeck, Germania). Le concentrazioni sono state espresse in pg/mL. I coefficienti di variazione intra-assay erano in media <10%, e i coefficienti di variazione inter-assay erano <15% per tutti gli assays.

Per i confronti tra i biomarkers liquorali, le stesse proteine sono state misurate in un gruppo di controllo di 43 soggetti appaiati per età e sesso, con altre condizioni non dementigene (OND), che si sono sottoposti al dosaggio liquorale a scopi diagnostici e di ricerca (Massa et al., 2024; Massa et al., 2022). Questo gruppo comprendeva 18 pazienti con idrocefalo normoteso, 9 con malattia cerebrovascolare, 7 con sclerosi laterale amiotrofica senza deficit cognitivo, 4 con disturbi infiammatori del sistema nervoso centrale o periferico, 3 individui con preoccupazioni soggettive in merito alle proprie capacità cognitive ma senza evidenza di un disturbo cognitivo in seguito a un work-up diagnostico esteso, e 2 soggetti sani che si sono sottoposti a puntura lombare per chirurgia ortopedica. Lo stato cognitivo è stato definito da MMSE >27 e CDR=0, e la patologia AD è stata esclusa in presenza di valori liquorali normali di A $\beta$ 42/40 e pTau181 (Jack et al., 2018).

### **5.3 Analisi statistica**

Sono state confrontate le variabili demografiche e cliniche tra EMCI e LMCI usando t-tests a due code o Wilcoxon rank-sum tests, a seconda di come era appropriato, con la correzione per confronti multipli. Le variabili categoriche sono state valutate tramite il test esatto di Fisher. I livelli dei biomarcatori liquorali nei gruppi EMCI, LMCI e OND sono stati analizzati tramite il Kruskal-Wallis test, seguito da confronti post-hoc corretti per il tasso dei falsi positivi (FDR) secondo il metodo di Benjamini-Hochberg. Le associazioni tra i biomarker liquorali e le variabili demografiche/cliniche sono state valutate tramite correlazioni di Spearman parziali corrette per età.

Per comprendere se la differente informazione sinaptica fornita da Ng e NPTX2 identifichi sottogruppi caratterizzati da una diversa probabilità di progressione clinica a breve termine - ovvero i LMCI che progrediscono a demenza entro 2 anni *vs* i pazienti che progrediscono più tardivamente (EMCI) - sono stati dicotomizzati i livelli di Ng e NPTX2 nel liquido cerebrospinale (CSF) sulla base delle mediane del campione, definendo così quattro quadranti Ng-NPTX2 (con low < mediana; high  $\geq$  mediana). La distribuzione dello stato di progressione (EMCI *vs* LMCI) tra i quattro quadranti è stata valutata mediante un test chi-quadrato di indipendenza 2 $\times$ 4. Inoltre, i partecipanti sono stati ulteriormente classificati in base al livello di CSF NPTX2 low *vs* high e CSF Ng low *vs* high, e sono state confrontate le

frequenze di LCMI usando il test esatto di Fisher a due code, riportando gli odds ratios (ORs).

Nella coorte di pazienti MCI sono stati standardizzati mediante z-score i biomarcatori. Il carico patologico AD è stato sintetizzato sotto forma di un singolo indice, che consente di catturare il carico di amiloide-tau in una metrica, definito come “AD Burden”, e calcolato come il rapporto tra  $z(p\text{Tau})$  e  $z(A\beta_{42}/40)$ . È stato preferito utilizzare il rapporto  $A\beta_{42}/40$  anziché  $A\beta_{42}$  come misura dell’amiloidosi considerando la maggiore accuratezza fornita da questo rapporto nella classificazione dell’AD (Hansson et al., 2019). Abbiamo derivato un residuo aggiustato per l’età di CSF NPTX2 (di seguito,  $\text{Res\_NPTX2}$ ), come residuo ottenuto da un modello di minimi quadrati ordinari (Ordinary Least Squares, OLS), basato sulla regressione di  $z(\text{NPTX2})$  su  $z(\text{Ng})$ , AD Burden e età. Pertanto,  $\text{Res\_NPTX2}$  è stato definito come il residuo di CSF NPTX2 aggiustato per l’età, condizionato ai valori standardizzati di Ng e al carico patologico dell’AD, ed è stato utilizzato come indicatore operativo all’interno del quadro compensatorio proposto. In seguito, è stato confrontato  $\text{Res\_NPTX2}$  tra i pazienti EMCI vs LMCI, e poi valutato in modelli di regressione OLS rispetto agli outcomes clinici, cioè MMSE BS, MMSE all’ultima visita di follow-up disponibile, e la loro differenza ( $\Delta\text{MMSE}$ , ossia  $[\text{MMSE BS} - \text{MMSE FU}]$ , dove valori positivi indicano un maggiore declino cognitivo). Per tenere conto della variabilità dello stato cognitivo alla diagnosi e in base alla durata del periodo di osservazione, la regressione OLS è stata nuovamente eseguita usando  $\Delta\text{MMSE}$  come variabile dipendente e  $\text{Res\_NPTX2}$  come variabile predittiva, aggiustando per MMSE BS e per la durata del follow-up (FU) in anni. Come analisi di sensibilità, abbiamo verificato se i valori  $z(\text{NPTX2})$  o  $z(\text{Ng})$  al baseline fossero predittivi del declino del MMSE nel tempo, mediante modelli di regressione OLS con  $\Delta\text{MMSE}$  come outcome, aggiustando per MMSE BS e per la durata del FU, e inserendo  $z(\text{NPTX2})$  e  $z(\text{Ng})$  in modelli separati o congiuntamente nello stesso modello.

Il tempo-alla-progression è stato analizzato utilizzando una regressione di Cox a rischi proporzionali con  $\text{Res\_NPTX2}$  come variabile predittiva. Il tempo è stato definito come l’intervallo tra la valutazione basale e la progressione clinica verso la demenza di Alzheimer (AD). I partecipanti che non sono progrediti sono stati censurati alla loro ultima visita di follow-up disponibile. Le dimensioni dell’effetto sono espresse come hazard ratio (HR) con intervalli di confidenza (IC) al 95%. Il modello principale ha valutato  $\text{Res\_NPTX2}$  come

predittore. Le analisi di sensibilità hanno analizzato (i) MMSE BS da solo oppure (ii) MMSE BS associato a Res\_NPTX2 per verificare se l'associazione tra Res\_NPTX2 e il tempo-alla-progressione rimanesse significativa all'aggiustamento per lo stato cognitivo basale. I modelli sono stati confrontati mediante il test del Chi-Quadrato del rapporto di verosimiglianza parziale (likelihood ratio, LR) (differenza in  $-2$  volte il log di verosimiglianza parziale), riportando  $\chi^2$  LR e p-values.

I partecipanti sono stati suddivisi in terzili di Res\_NPTX2 (Basso  $\leq -0.38$ ; Intermedio da  $-0.38$  a  $0.09$ ; Alto  $> 0.09$ ). Il tempo-alla-progressione verso la demenza di Alzheimer è stato analizzato tramite le curve di Kaplan–Meier ed è stato confrontato con il test log-rank; è stato utilizzato un test log-rank ordinato per la tendenza al fine di valutare la presenza di andamenti monotoni tra i terzili. Inoltre, è stato riportato il test di Gehan–Breslow–Wilcoxon come una analisi di sensibilità per attribuire un peso maggiore agli eventi precoci. I pazienti che non sono andati incontro a progressione a demenza sono stati censurati alla loro ultima visita di follow-up disponibile. Gli hazard ratio sono stati stimati usando la regressione di Cox a rischi proporzionali, modellando i terzili come variabili categoriche tramite una codifica fittizia (considerando Basso come riferimento) per ottenere i confronti Intermedio vs Basso e Alto vs Basso senza assumere una relazione lineare. I confronti post-hoc a coppie mediante test del log-rank (Basso-Intermedio, Basso-Alto, Intermedio-Alto) sono stati eseguiti con la correzione di Holm–Šidák.

Come analisi di sensibilità focalizzata sulla progressione precoce, abbiamo applicato una censura amministrativa a 2 anni, tramite l'interruzione del follow-up a 2 anni e considerando come eventi esclusivamente le progressioni a demenza avvenute entro questo periodo, con tutte le altre osservazioni censurate. Abbiamo inoltre eseguito un'analisi con landmark a 2 anni, limitata ai partecipanti privi di eventi entro questa soglia, reindicizzando il tempo a partire dal landmark dei 2 anni e modellando il rischio di progressione oltre il secondo anno.

## **5.4 Framework di compensazione a due livelli e interpretabilità clinica**

In questa analisi esplorativa, abbiamo definito bande di NPTX2 riferite al gruppo OND utilizzando la distribuzione di NPTX2 nel liquido cerebrospinale (CSF) misurata nel gruppo OND (media  $\pm$ DS  $832.9 \pm 526.8$  pg/mL). Sulla base di soglie fisse a  $\pm 0.5$  DS rispetto alla

media OND, abbiamo classificato i pazienti MCI-AD come: Basso se  $\text{NPTX2} \leq 569.5$  pg/mL, Alto se  $\text{NPTX2} \geq 1096.3$  pg/mL e Intermedio negli altri casi.

Queste bande riferite a OND (di seguito,  $\text{NPTX2}_{\text{OND}}$ ) sono state utilizzate come un primo livello da integrare con la metrica di compensazione basata sui residui ( $\text{Res\_NPTX2}$ ). L'ancoraggio al gruppo OND è stato applicato esclusivamente al CSF  $\text{NPTX2}$  per fornire un riferimento esterno clinicamente interpretabile, mentre  $\text{Res\_NPTX2}$  è stato derivato all'interno della coorte MCI-AD per quantificare la componente specifica di  $\text{NPTX2}$  condizionata dal danno sinaptico (Ng), dal carico di AD e dall'età, come precedentemente descritto. Abbiamo quindi definito tre fenotipi di compensazione: i) compensazione preservata ( $\text{NPTX2}_{\text{OND}}$  alto &  $\text{Res\_NPTX2}$  alto  $> 0.09$ ); ii) fallimento della compensazione ( $\text{NPTX2}_{\text{OND}}$  basso e  $\text{Res\_NPTX2}$  basso  $\leq -0.38$ ); iii) intermedio (tutti gli altri casi).

Queste etichette dovrebbero essere interpretate come profili prognostici dei biomarcatori anziché come una evidenza diretta di meccanismi compensatori attivi. Le differenze tra gruppi nella frequenza di progressione a breve termine ( $\text{LMCI} \leq 2$  anni) sono state testate mediante test del chi-quadrato.

L'analisi statistica è stata svolta utilizzando Jamovi (versione 2.6) e Prism (versione 10.2.1, GraphPad Software, San Diego, California, USA), con una soglia di significatività fissata a  $p < 0.05$ .

## 5.5 Acquisizione e analisi statistica delle [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET

Le scansioni [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET sono state ottenute al baseline seguendo le attuali linee guida della European Association of Nuclear Medicine (EANM) (Varrone et al., 2009; Guedj et al., 2022). La metodologia di acquisizione e pre-elaborazione delle immagini è in linea con studi precedenti (Massa et al., 2022, 2024; Pelagotti et al., 2025). Nello specifico, i partecipanti si sono sottoposti a un digiuno di almeno 6 ore e presentavano livelli di glicemia inferiori a 7.8 mmol/l al momento dell'esame. Prima dell'iniezione del tracciante, i soggetti si sono riposati per dieci minuti in una stanza tranquilla e scarsamente illuminata, mantenendo gli occhi aperti e gli stimoli sensoriali ridotti al minimo. È stata somministrata per via endovenosa una dose di 185-250 MBq di [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, e l'acquisizione delle immagini

è iniziata circa 45 minuti dopo, con una durata della scansione di 15 minuti, utilizzando un Sistema PET/TC Siemens Biograph 16. Le immagini sono state ricostruite tramite algoritmo Ordered Subset Expectation Maximization (OSEM), seguendo i protocolli clinici standard, con correzione dell'attenuazione basata sulla TC. Il pre-processamento delle immagini è stato effettuato usando MATLAB e Statistical Parametric Mapping (SPM12; Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, London, UK). Le immagini sono state normalizzate spazialmente a un template [<sup>18</sup>F]FDG-PET per malattie neurodegenerative nello spazio MNI (Della Rosa et al., 2014), ricampionate a voxels 2 x 2 x 2 mm<sup>3</sup>, e sottoposte a smoothing mediante un filtro Gaussiano isotropico con larghezza a metà altezza (Full Width at Half Maximum, FWHM) di 10 mm. Tutte le immagini sono state sottoposte a ispezione visiva per un controllo qualità da parte di due lettori esperti (FM e SR), al fine di garantire l'accuratezza del pre-processamento.

Pertanto dopo la pre-elaborazione, le immagini dei pazienti MCI-AD sono state sottoposte ad analisi di gruppo voxel-based (VBA) utilizzando il software Statistical Parametric Mapping (SPM12), esplorando l'intero cervello senza ipotesi a priori sulle regioni cerebrali coinvolte, comprendendo:

1. il confronto tra le scansioni dei pazienti e quelle di un gruppo di controllo sano (HC) di 40 volontari appaiati per età, sesso e livello di istruzione (Massa et al., 2022, 2024; Pelagotti et al., 2025) (mediante un t-test a due campioni), con l'età come covariata. Le regioni relativamente ipometaboliche nei pazienti sono state identificate come volumi di interesse correlati all'AD (MCI-AD VOIs);
2. il confronto tra pazienti EMCI e LMCI (mediante un t-test a due campioni; con l'età come covariata) per definire le regioni che mostrano un differente metabolismo cerebrale nello stadio più avanzato di MCI, più prossimo alla demenza, rispetto allo stadio precoce di MCI;
3. l'analisi di regressione lineare multipla per identificare volumi di interesse (VOIs) correlati a CSF NPTX2 utilizzando l'uptake regionale di [<sup>18</sup>F]FDG come variabile dipendente, i valori di CSF NPTX2 come covariata, aggiustando il modello per età. La CSF Ng è stata successivamente inclusa come covariata nel modello a scopo esplorativo. Analogamente, è stata eseguita una analisi di regressione lineare multipla per identificare VOIs correlate a Res\_NPTX2, aggiustando per età.

I valori voxel sono stati normalizzati rispetto all'attività della corteccia cerebellare seguendo l'approccio descritto in lavori precedenti (Massa et al., 2024; Pelagotti et al., 2025). Questa normalizzazione migliora la rilevazione delle alterazioni corticali, tramite il presupposto che il cervelletto sia presumibilmente non coinvolto nell'AD. Per la VBA, i valori di CSF NPTX2 sono stati trasformati in una scala logaritmica a causa della distribuzione asimmetrica a destra ( $p < 0.001$  al test di Lilliefors), permettendo in questo modo l'applicazione di modelli lineari. L'analisi è stata condotta esclusivamente nel gruppo MCI-AD.

È stata applicata una soglia standard pari a 0.8 circa i valori dei voxel e una soglia statistica a livello di voxel di  $p < 0.002$  (non corretto). Solo cluster con una dimensione minima di cluster di 100 voxel e significativi alla soglia statistica di  $p < 0.05$ , con correzione per family-wise error (FWE) per confronti multipli, sono stati considerati significativi. Le coordinate dei clusters sono state elaborate utilizzando i software GingerALE e Talairach Client per allinearle dall'atlante nativo (Montreal Neurological Institute, MNI) all'atlante di Talairach, al fine di una più precisa localizzazione delle regioni di interesse secondo la classificazione di Brodmann.

## 6. Risultati

### 6.1 Dati clinici e biomarcatori nel liquido cerebrospinale (CSF)

**Tabella 5.** Caratteristiche cliniche e livelli dei biomarkers liquorali di pazienti MCI-AD

| Demographical / clinical variables | MCI-AD (n=104) | EMCI (n=74)    | LMCI (n=30)   |               | p value <sup>#</sup> | p <sub>ADJ</sub> value*                   |
|------------------------------------|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------------|-------------------------------------------|
| Age (years)                        | 72.6 ± 6.9     | 72.9 ± 6.4     | 71.7 ± 8.2    |               | 0.669                | >0.99                                     |
| Sex (M:F)                          | 42:62          | 33:41          | 9:21          |               | 0.192 <sup>§</sup>   |                                           |
| Education                          | 10.8 ± 4.4     | 11.0 ± 4.2     | 10.5 ± 4.8    |               | 0.548                | >0.99                                     |
| MMSE BS                            | 26.1 ± 2.6     | 26.7 ± 2.3     | 24.6 ± 2.7    |               | <b>&lt;0.001</b>     | <b>&lt;0.001</b>                          |
| MMSE FU                            | 20.1 ± 5.8     | 21.8 ± 5.5     | 16.0 ± 4.6    |               | <b>&lt;0.001</b>     | <b>&lt;0.001</b>                          |
| Δ MMSE                             | 6.0 ± 5.3      | 4.9 ± 5.2      | 8.8 ± 4.5     |               | <b>&lt;0.001</b>     | <b>&lt;0.001</b>                          |
| CSF biomarkers                     | MCI-AD (n=104) | EMCI (n=74)    | LMCI (n=30)   | OND (n=43)    | p-value <sup>¶</sup> | Post-hoc comparisons <sup>‡</sup>         |
| Aβ42/Aβ40 ratio                    | 0.046 ± 0.010  | 0.046 ± 0.010  | 0.048 ± 0.010 | 0.098 ± 0.015 | <b>&lt;0.0001</b>    | EMCI < OND p<0.001<br>LMCI < OND p<0.001  |
| pTau181 (pg/ml)                    | 108.7 ± 58.3   | 110.0 ± 62.11  | 105.4 ± 48.6  | 26.2 ± 9.1    | <b>&lt;0.0001</b>    | EMCI > OND p<0.001<br>LMCI > OND p<0.001  |
| t-Tau (pg/ml)                      | 723.8 ± 367.8  | 728.2 ± 377.5  | 712.8 ± 348.3 | 233.3 ± 106.4 | <b>&lt;0.0001</b>    | EMCI > OND p<0.001<br>LMCI > OND p<0.001  |
| NPTX2 (pg/ml)                      | 1022.3 ± 527.1 | 1141.2 ± 559.0 | 729.0 ± 274.2 | 832.9 ± 526.8 | <b>0.001</b>         | EMCI > OND p<0.001<br>EMCI > LMCI p<0.001 |
| Ng (pg/ml)                         | 636.6 ± 328.8  | 676.9 ± 337.1  | 537.3 ± 288.9 | 248.4 ± 156.4 | <b>&lt;0.0001</b>    | EMCI > OND p<0.001<br>LMCI > OND p<0.001  |

<sup>§</sup>p-values for Fisher's exact test

<sup>#</sup>p-values for Wilcoxon rank-sum test between EMCI and LMCI subgroups

\* Bonferroni-Dunn adjusted p-value

<sup>¶</sup>p-values for Kruskal–Wallis comparing EMCI, LMCI, and OND subgroups

<sup>‡</sup>p-values for Benjamini–Hochberg FDR-corrected post-hoc comparisons

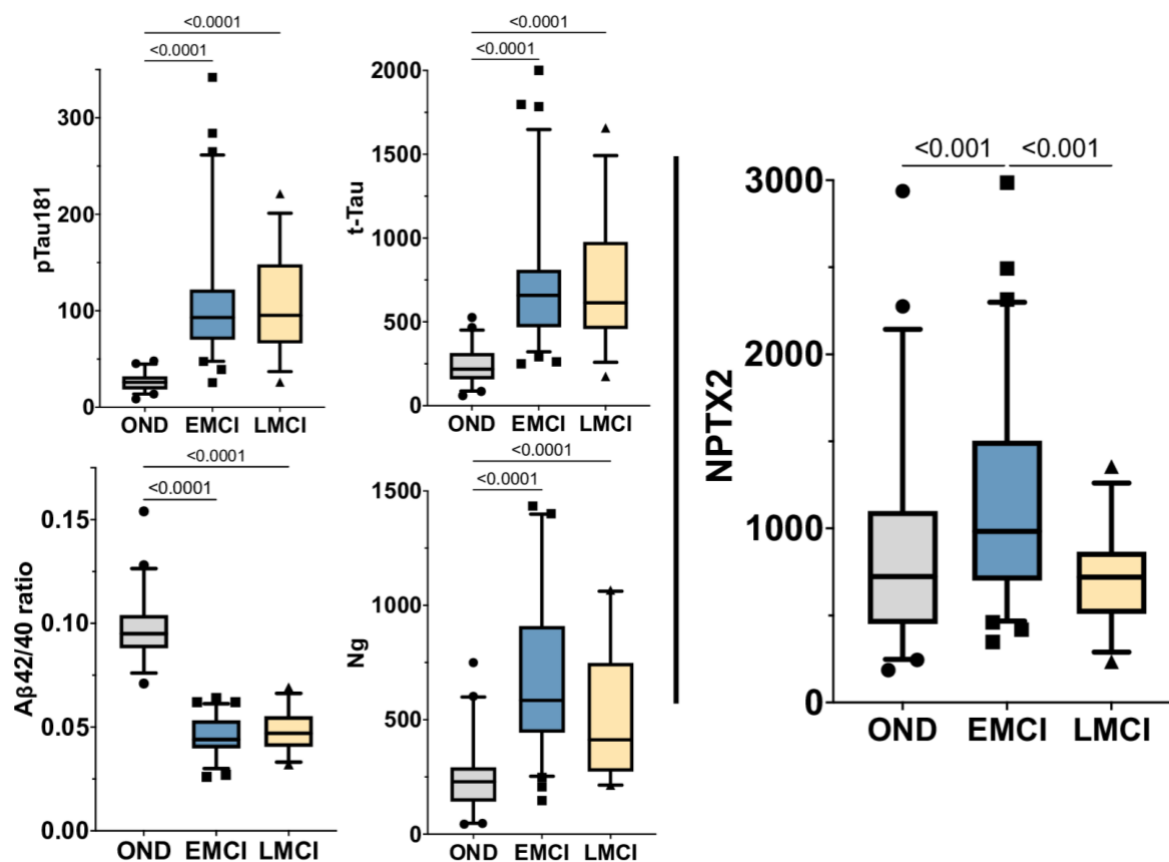
Mean±SD are shown. Significant values are in **bold**.

*Abbreviations.* MCI-AD Mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease, EMCI Early mild cognitive impairment, LMCI Late mild cognitive impairment, F female, M male, MMSE Mini Mental State Examination, BS Baseline, FU, Follow-up, CSF Cerebrospinal fluid, Aβ42/Aβ40 ratio amyloid Aβ1-42 normalized for amyloid Aβ1-40, pTau181 Tau phosphorylated at threonine 181, t-Tau total Tau, NPTX2 Neuronal Pentraxin 2, Ng Neurogranin

La Tabella 5 riassume le caratteristiche clinico-demografiche e i valori dei biomarcatori CSF nei pazienti affetti da MCI-AD. I partecipanti sono stati suddivisi in EMCI (n=74) e LMCI (n=30) in base alla progressione entro 2 anni. Rispetto al gruppo EMCI, il sottogruppo LMCI

mostrava valori inferiori di MMSE al baseline ( $24.6 \pm 2.7$  vs  $26.7 \pm 2.3$ ;  $p < 0.001$ ) e al follow-up ( $16.0 \pm 4.6$  vs  $21.8 \pm 5.5$ ;  $p < 0.001$ ), oltre a un maggiore  $\Delta$ MMSE ( $8.8 \pm 4.5$  vs  $4.9 \pm 5.2$ ;  $p < 0.001$ ).

Nelle analisi di gruppo, i biomarcatori liquorali *core* dell'AD e Ng differivano tra EMCI e LMCI se confrontati con OND ( $p < 0.001$ ), ma non tra EMCI e LMCI. Al contrario, i livelli di NPTX2 nel CSF erano diversi tra i gruppi ( $p = 0.001$ ) e nelle analisi post-hoc si osservavano valori più elevati di NPTX2 nel gruppo EMCI rispetto a LMCI e OND ( $p = 0.001$  per entrambi) (Tabella 5 e Figura 6).



**Figura 6. Biomarcatori liquorali core dell'AD e proteine sinaptiche nei gruppi OND, EMCI e LMCI.**

I diagrammi Box-and-whisker mostrano le concentrazioni al baseline nel liquor del rapporto Aβ42/40, p-Tau181, t-Tau, neurogranina (Ng), e neuronal pentraxin-2 (NPTX2) nei controlli non dementi (OND) e nei pazienti con Mild Cognitive Impairment dovuto alla malattia di Alzheimer (MCI-AD), stratificati in stadio precoce (EMCI) e tardivo (LMCI) in base allo stato di progressione a due anni. I box rappresentano la mediana e l'intervallo interquartile

(IQR), e i baffi indicano i valori tra il 5% e il 95% percentile. Ogni valore di p statisticamente significativo, corretto per FDR, è riportato numericamente nel grafico.

Nelle analisi di Spearman corrette per età dei biomarcatori liquorali nella coorte di pazienti MCI-AD, il rapporto A $\beta$ 42/40 mostrava una correlazione negativa sia con p-Tau181 (p=0.003, r=-0.29) sia con t-Tau (p=0.024, r=-0.22), come previsto. CSF NPTX2 e Ng erano fortemente correlate positivamente tra loro (p<0.001, r=0.67) ed entrambe mostravano associazioni significative con i biomarcatori *core* dell'AD (tutti con p≤0.002).

Per quanto riguarda la cognizione, NPTX2 liquorale mostrava una correlazione positiva con il punteggio MMSE al baseline (p=0.050, r=0.19) e aveva una correlazione addirittura più forte con il MMSE al follow-up (p<0.001, r=0.38). Il punteggio MMSE al baseline era associato agli anni di istruzione (p=0.006) e, come prevedibile, con il MMSE al follow-up (p<0.001), che a sua volta correlava significativamente con p-tau181 (p=0.003) e t-tau (p=0.018) (Tabella 6).

**Tabella 6.** Correlazioni di Spearman corrette per età

|          |                | A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 | p-Tau181         | t-Tau            | NPTX2            | Ng    | Edu          | MMSE BS          |
|----------|----------------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|-------|--------------|------------------|
| p-Tau181 | Spearman's rho | -0.29                     |                  |                  |                  |       |              |                  |
|          | p value        | <b>0.003</b>              |                  |                  |                  |       |              |                  |
| t-Tau    | Spearman's rho | -0.22                     | 0.95             |                  |                  |       |              |                  |
|          | p value        | <b>0.024</b>              | <b>&lt;0.001</b> |                  |                  |       |              |                  |
| NPTX2    | Spearman's rho | -0.30                     | 0.32             | 0.37             |                  |       |              |                  |
|          | p value        | <b>0.002</b>              | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |                  |       |              |                  |
| Ng       | Spearman's rho | -0.31                     | 0.65             | 0.68             | 0.67             |       |              |                  |
|          | p value        | <b>0.001</b>              | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |       |              |                  |
| EDU      | Spearman's rho | 0.11                      | -0.10            | -0.09            | -0.07            | -0.12 |              |                  |
|          | p value        | 0.276                     | 0.32             | 0.380            | 0.503            | 0.215 |              |                  |
| MMSE BS  | Spearman's rho | -0.09                     | 0.03             | 0.04             | 0.19             | 0.05  | 0.27         |                  |
|          | p value        | 0.374                     | 0.76             | 0.671            | <b>0.050</b>     | 0.580 | <b>0.006</b> |                  |
| MMSE FU  | Spearman's rho | -0.08                     | -0.29            | -0.23            | 0.38             | 0.10  | 0.17         | 0.38             |
|          | p value        | 0.441                     | <b>0.003</b>     | <b>0.018</b>     | <b>&lt;0.001</b> | 0.310 | 0.095        | <b>&lt;0.001</b> |

Statistical significant p-values are in **bold**.

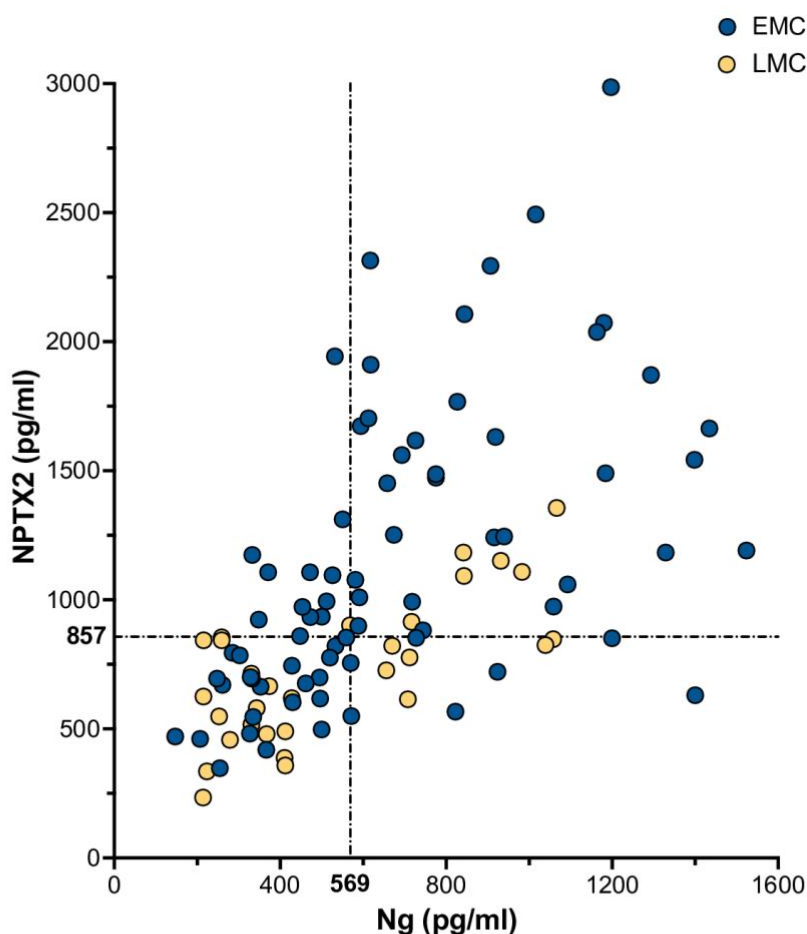
A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio amyloid A $\beta$ 1-42 normalized for amyloid A $\beta$ 1-40, pTau181 Tau phosphorylated at threonine 181, t-Tau total Tau, Cerebrospinal fluid, NPTX2 Neuronal Pentraxin 2, Ng Neurogranin, Edu, education, MMSE Mini Mental State Examination, BS Baseline, FU Follow-up

Dopo aver suddiviso i valori liquorali di Ng e NPTX2 in base alle mediane del campione (rispettivamente 569.1 pg/ml e 857.1 pg/ml) e aver assegnato ciascun partecipante a uno dei

quattro quadranti Ng–NPTX2 (con low < mediana; high ≥ mediana), è risultato evidente come la proporzione di LMCI differisse in modo molto marcato tra i quadranti (Figura 7):

- 7.7% nel gruppo Ng low/NPTX2 high (1/13)
- 15.4% nel gruppo Ng high/NPTX2 high (6/39)
- 43.6% nel gruppo Ng low/NPTX2 low (17/39)
- 46.2% nel gruppo Ng high/NPTX2 low (6/13)

È stata dunque dimostrata un'associazione significativa tra quadranti e stato di progressione ( $\chi^2(3)=12.31$ ,  $p=0.006$ ) (Figura 8).

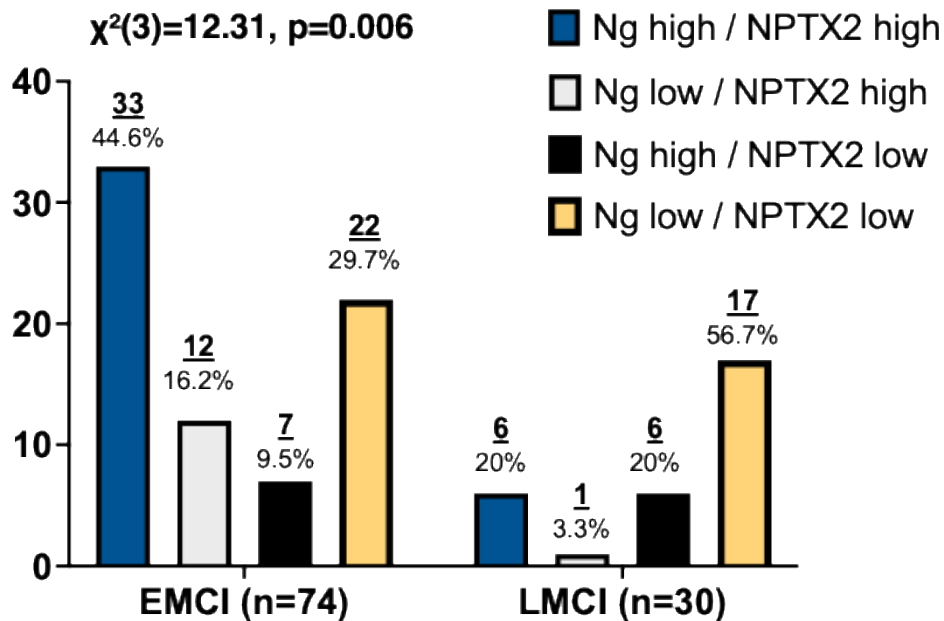


|                      | MCI-AD | LMCI (n) | LMCI (%) |
|----------------------|--------|----------|----------|
| Ng low / NPTX2 high  | 13     | 1        | 7.7%     |
| Ng high / NPTX2 high | 39     | 6        | 15.4%    |
| Ng low / NPTX2 low   | 39     | 17       | 43.6%    |
| Ng high / NPTX2 low  | 13     | 6        | 46.2%    |

**Figura 7. Quadranti Ng–NPTX2 in funzione del gruppo di progressione (EMCI vs LMCI).** Scatterplot dei livelli basali di CSF NPTX2 Vs CSF Ng (pg/mL), con i punti colorati a seconda del gruppo di progressione (EMCI vs LMCI). Le line tratteggiate verticali e orizzontali indicano le

mediane della coorte (Ng = 569 pg/mL; NPTX2 = 857 pg/mL), definendo così quattro quadranti ottenuti dalla suddivisione alla mediana (Ng low/NPTX2 low, Ng low/NPTX2 high, Ng high/NPTX2 low, Ng high/NPTX2 high). La tabella riporta il numero dei partecipanti in ciascun quadrante e la corrispondente proporzione di pazienti classificati come LMCI.

### Distribution of CSF Ng–NPTX2 quadrants in EMCI and LMCI



**Figura 8.** La distribuzione dei quadranti Ng–NPTX2 differisce tra EMCI e LMCI.

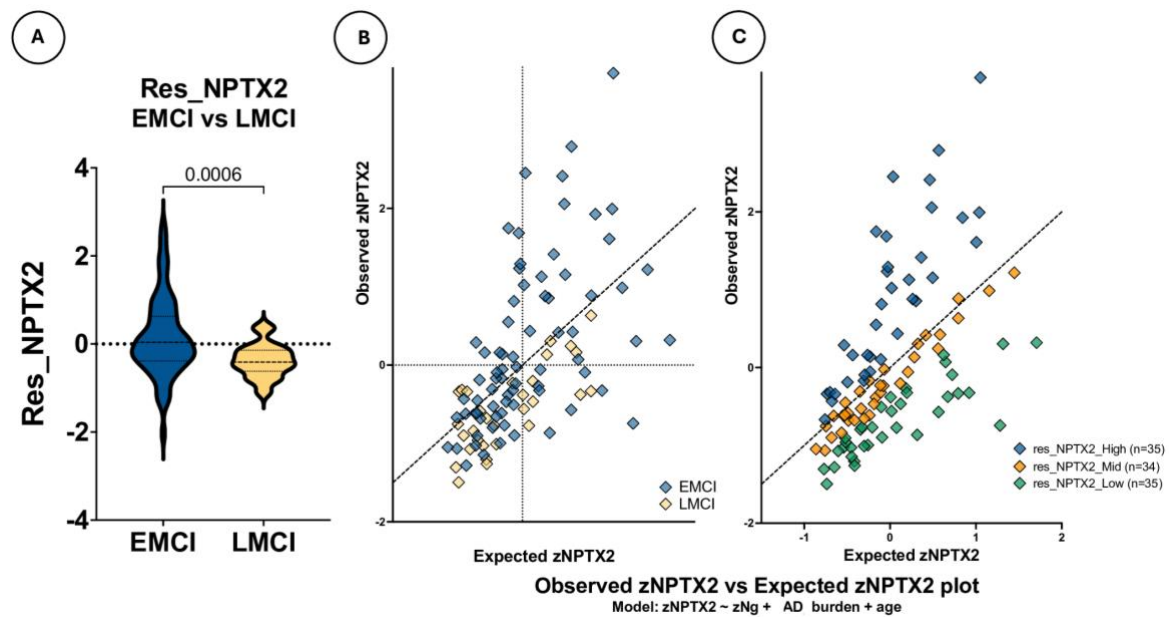
Grafico a barre che mostra il numero di partecipanti in ciascuno dei quadranti definiti dalla mediana di Ng e NPTX2 nei gruppi EMCI e LMCI. Le differenze nella distribuzione dei gruppi tra i quadranti sono state valutate mediante un test del chi-quadrato ( $\chi^2(3)=12.31, p=0.006$ ), evidenziando un'associazione significativa tra lo stadio di progressione e l'appartenenza ai quadranti Ng–NPTX2.

Nel complesso, questa classificazione basata sulla mediana indicava che la vicinanza alla progressione era meglio rappresentata da CSF NPTX2. Raggruppando i partecipanti in base ai livelli di NPTX2 nel CSF, la frequenza di LMCI risultava sostanzialmente più elevata nel gruppo con basso NPTX2 (23/52, 44.2%) rispetto al gruppo con alto NPTX2 (7/52, 13.5%;  $p=0.001$ , 95% CI 1.94-13.40, OR=5.10). Al contrario, il raggruppamento basato su CSF Ng non mostrava differenze significative (low Ng: 18/52, 34.6% vs high Ng: 12/52, 23.1%;  $p=0.279$ ).

Il modello lineare del valore al baseline di  $z(NPTX2)$  su  $z(Ng)$ , AD burden ed età risultava significativo ( $F(3,100)=16.30, p<0.0001$ ) e spiegava circa il 33% della varianza di  $z(NPTX2)$  ( $R^2=0.33$ ;  $R^2$  corretto=0.31).  $z(Ng)$  era l'unico predittore significativo ( $\beta=0.62$ ,

95% CI 0.40-0.83;  $p < 0.0001$ ), mentre AD burden ( $\beta = -0.07$ ;  $p = 0.507$ ) ed età ( $\beta = -0.002$ ;  $p = 0.828$ ) non risultavano associati a  $z(\text{NPTX2})$  (Tabella 7A).

I valori di  $\text{Res\_NPTX2}$  erano significativamente più elevati nel gruppo EMCI rispetto a quello LMCI ( $p = 0.0006$ ) (Figura 9A). A livello individuale, EMCI mostrava più frequentemente deviazioni positive tra il valore  $z(\text{NPTX2})$  osservato e quello atteso, mentre LMCI mostrava deviazioni negative (Figura 9B). Nel complesso, questi dati supportano  $\text{Res\_NPTX2}$  come una metrica interpretabile basata sui residui che consente di catturare una componente della capacità adattiva correlata a  $\text{NPTX2}$ , successivamente valutata rispetto agli esiti clinici nell'ambito del quadro compensatorio proposto.



**Figura 9.**

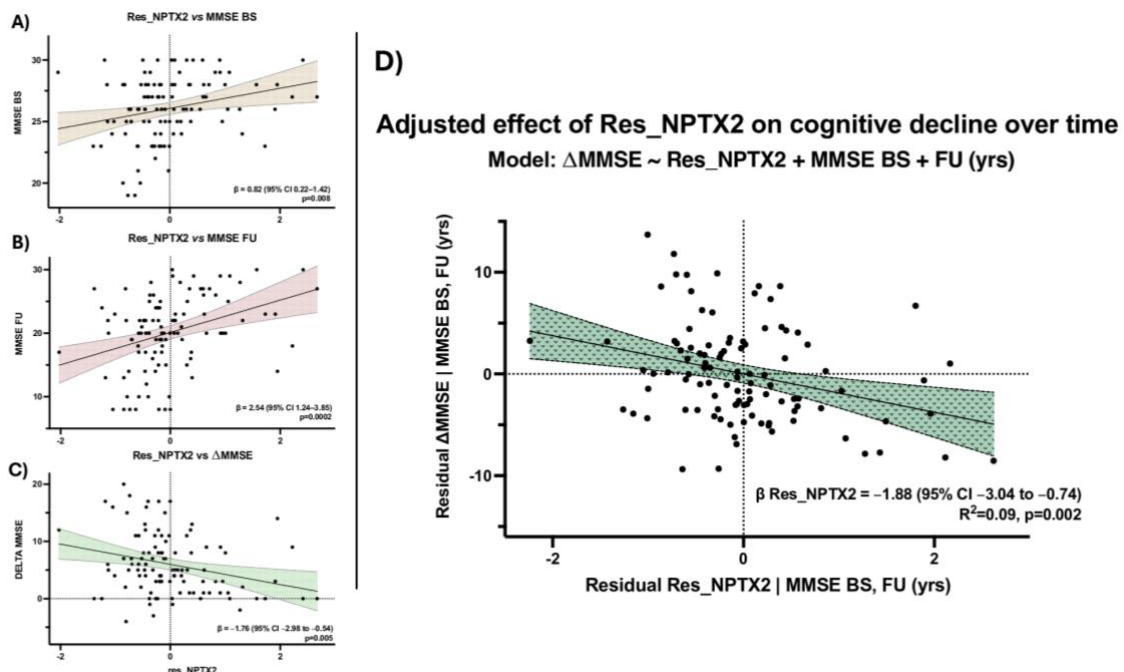
**A  $\text{Res\_NPTX2}$  nei gruppi EMCI vs LMCI.** I violin plots mostrano la distribuzione dei valori di  $\text{Res\_NPTX2}$  nei pazienti EMCI e LMCI. La linea orizzontale di riferimento a 0 indica il valore atteso (nessuna deviazione rispetto alla previsione del modello). La linea tratteggiata centrale rappresenta la mediana, e le linee a puntini indicano l'intervallo interquartile. La differenza tra i gruppi è stata valutata con il Wilcoxon rank-sum test a due code (con p-value riportato numericamente).

**B. Valori di  $z(\text{NPTX2})$  osservati Vs attesi in funzione del gruppo di progressione.** Scatterplot dei valori osservati al baseline di  $z(\text{NPTX2})$  (asse y) rispetto ai valori attesi di  $z(\text{NPTX2})$  (asse x), ottenuti dal modello predittivo  $z(\text{NPTX2}) \sim z(\text{Ng}) + \text{AD Burden} + \text{età}$ . La linea tratteggiata di identità ( $y = x$ ) rappresenta la perfetta concordanza tra valori osservati e attesi; gli scostamenti verticali rispetto a questa linea corrispondono al residuo ( $\text{Res\_NPTX2}$ ). I rombi hanno un codice colore in base allo stato di progressione clinica (EMCI vs LMCI).

**C. Valori di  $z(\text{NPTX2})$  osservati Vs attesi stratificati per terzili di  $\text{Res\_NPTX2}$ .** Lo stesso grafico del pannello B, con i rombi colorati in base ai terzili di  $\text{Res\_NPTX2}$  (High, Mid, Low). I partecipanti appartenenti al terzile più elevato di  $\text{Res\_NPTX2}$  si collocano prevalentemente al di

sopra della linea di identità (residuo positivo: livelli di NPTX2 superiori rispetto a quelli attesi sulla base dei valori di Ng, del Burden di AD e dell'età), mentre i soggetti appartenenti al terzile più basso si collocano prevalentemente al di sotto della linea di identità.

Valori più elevati di Res\_NPTX2 erano associati a un punteggio MMSE più alto sia al baseline ( $\beta=0.82$ ; 95% CI 0.22-1.42;  $R^2=0.07$ ;  $p=0.008$ ) sia al follow-up ( $\beta=2.54$ ; 95% CI 1.24-3.85;  $R^2=0.13$ ;  $p=0.0002$ ) (Figura 10A-B). Inoltre, valori più elevati di Res\_NPTX2 predicavano una minore diminuzione del MMSE ( $\Delta$ MMSE) ( $\beta=-1.76$ ; 95% CI da -2.98 a -0.54;  $R^2=0.07$ ;  $p=0.005$ ), anche dopo aver effettuato una correzione per MMSE BS e durata del follow-up ( $\beta=-1.88$ ; 95% CI da -3.04 a -0.73;  $p=0.002$ ;  $R^2$  del modello=0.24) (Figura 10C-D e Tabelle 7B-7C).



**Figura 10. Res\_NPTX2 e declino cognitivo.**

(A) Scatterplot del punteggio MMSE al baseline (MMSE\_BS) Vs Res\_NPTX2 al baseline, con una retta di regressione ai minimi quadrati e banda di confidenza al 95% ( $\beta = 0.82$ ; IC 95%: 0.22-1.42;  $p = 0.008$ ).

(B) Scatterplot del punteggio MMSE al follow-up (MMSE\_FU) Vs Res\_NPTX2 al baseline ( $\beta = 2.54$ ; IC 95%: 1.24-3.85;  $p = 0.0002$ ).

(C) Scatterplot del declino cognitivo ( $\Delta$ MMSE = MMSE\_BS - MMSE\_FU; valori più elevati indicano un maggiore deterioramento cognitivo) Vs Res\_NPTX2 al baseline ( $\beta = -1.76$ ; IC 95% da -2.98 a -0.54;  $p = 0.005$ ).

(D) Grafico delle variabili aggiunte (added-variable plot o grafico di regressione parziale) che raffigura l'associazione aggiustata tra Res\_NPTX2 e declino cognitivo nel modello multivariato  $\Delta$ MMSE ~ Res\_NPTX2 + MMSE\_BS + durata del follow-up (anni). L'asse y mostra i residui di

$\Delta$ MMSE dopo la rimozione degli effetti del MMSE\_BS e della durata del follow-up; l'asse x mostra i residui di Res\_NPTX2 ottenuti dopo l'aggiustamento per le stesse covariate. La retta di regressione e la banda di confidenza al 95% corrispondono al coefficiente aggiustato di Res\_NPTX2 ( $\beta = -1.88$ ; IC 95% da 3.04 a -0.74;  $p = 0.002$ ;  $R^2$  parziale  $\approx 0.09$ ). Le linee di riferimento tratteggiate indicano residui pari a zero.

**Tabella 7.** Modelli di regressione lineare multivariabile

| Panel A. Predicting z(NPTX2) (model used to derive Res_NPTX2)                     |                       |                      |                |            |         |                        |                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------|------------|---------|------------------------|--------------------|
| Model fit                                                                         | N                     | DF (model, residual) | F              |            | p-value | R <sup>2</sup>         | Adj R <sup>2</sup> |
|                                                                                   | 104                   | 3, 100               | 16.30          |            | <0.0001 | 0.33                   | 0.31               |
| Predictor                                                                         | $\beta$               | SE                   | 95% CI         | t (df=100) | p-value | Partial R <sup>2</sup> | VIF                |
| Intercept                                                                         | 0.189                 | 0.872                | -1.54 to 1.92  | 0.22       | 0.829   | —                      | —                  |
| z(Ng)                                                                             | 0.619                 | 0.109                | 0.40 to 0.83   | 5.69       | <0.0001 | 0.24                   | 1.76               |
| AD burden                                                                         | -0.072                | 0.108                | -0.29 to 0.14  | 0.66       | 0.508   | 0.004                  | 1.74               |
| Age                                                                               | -0.0026               | 0.0120               | -0.03 to 0.02  | 0.22       | 0.828   | 0.0005                 | 1.02               |
| Panel B. Simple linear regression models between Res_NPTX2 and cognitive outcomes |                       |                      |                |            |         |                        |                    |
| Predictor                                                                         | Outcome               | $\beta$ (slope)      | 95% CI         |            | p-value | R <sup>2</sup>         |                    |
| Res_NPTX2                                                                         | MMSE BS               | +0.82                | 0.22 to 1.42   |            | 0.008   | 0.07                   |                    |
| Res_NPTX2                                                                         | MMSE FU               | +2.54                | 1.24 to 3.85   |            | 0.0002  | 0.13                   |                    |
| Res_NPTX2 (BS-FU)                                                                 | $\Delta$ MMSE (BS-FU) | -1.76                | -2.98 to -0.54 |            | 0.005   | 0.07                   |                    |
| Panel C. Predicting $\Delta$ MMSE (BS-FU)                                         |                       |                      |                |            |         |                        |                    |
| Model fit                                                                         | N                     | DF (model, residual) | F              |            | p-value | R <sup>2</sup>         | Adj R <sup>2</sup> |
|                                                                                   | 104                   | 3, 100               | 10.59          |            | <0.0001 | 0.24                   | 0.22               |
| Predictor                                                                         | $\beta$               | SE                   | 95% CI         | t          | p-value | Partial R <sup>2</sup> | VIF                |
| Intercept                                                                         | 0.88                  | 4.83                 | -8.69 to 10.46 | 0.18       | 0.856   | —                      | —                  |
| Res_NPTX2                                                                         | -1.88                 | 0.58                 | -3.04 to -0.74 | -3.23      | 0.002   | 0.09                   | 1.07               |
| MMSE BS                                                                           | 0.068                 | 0.188                | -0.305 to      | 0.36       | 0.720   | 0.001                  | 1.11               |
| FU (years)                                                                        | 1.03                  | 0.23                 | 0.58 to 1.48   | 4.52       | <0.0001 | 0.17                   | 1.04               |

Two-sided p-values are reported; 95% confidence intervals are shown.

All models were fit by ordinary least squares (OLS).  $\beta$  values are unstandardized regression coefficients (slopes).  $z()$  indicates within-cohort z-transformation. In Panel A, the model predicts  $z(\text{NPTX2})$  from  $z(\text{Ng})$ , AD burden, and age;  $\text{Res\_NPTX2}$  is defined as the residual of this model (observed minus model-predicted  $z(\text{NPTX2})$ ). In Panel B and C,  $\Delta\text{MMSE}$  is defined as MMSE baseline minus MMSE follow-up; therefore, higher  $\Delta\text{MMSE}$  indicates greater cognitive decline. FU (years) is the follow-up duration in years. Partial  $R^2$  reflects the unique variance explained by each predictor (e.g.,  $\text{SS\_effect}/(\text{SS\_effect}+\text{SS\_error})$ ). VIF values quantify multicollinearity (lower values indicate negligible collinearity).

Abbreviations. AD, Alzheimer's disease; BS, baseline; CI, confidence interval; df, degrees of freedom; FU, follow-up; MMSE, Mini-Mental State Examination; Ng, neurogranin; NPTX2, neuronal pentraxin-2;  $\text{Res\_NPTX2}$ , residual NPTX2 component (as defined above); SE, standard error; VIF, variance inflation factor.

Nell'analisi di sensitività, finalizzata a verificare se i valori di  $z(\text{NPTX2})$  e  $z(\text{Ng})$  al baseline fossero associati a  $\Delta\text{MMSE}$  indipendentemente (aggiustando per MMSE BS e per la durata del follow-up), l'unico biomarcatore in grado di predire un minor declino del MMSE risultava essere  $z(\text{NPTX2})$ , ma non  $z(\text{Ng})$ :

- $z(\text{NPTX2})$ :  $\beta=-1.55$  punti per SD; 95% CI da -2.50 a -0.61;  $p=0.0015$
- $z(\text{Ng})$ :  $\beta=-0.43$ ; 95% CI da -1.39 a 0.53;  $p=0.38$

Quando  $z(\text{NPTX2})$  e  $z(\text{Ng})$  sono stati inseriti simultaneamente nel modello,  $z(\text{NPTX2})$  è rimasto associato in modo indipendente a un minor declino cognitivo ( $\beta=-1.95$ ; 95% CI da -3.10 a -0.80;  $p=0.001$ ), mentre  $z(\text{Ng})$  non mostrava un effetto indipendente ( $p=0.24$ ) (Tabella 8).

**Tabella 8.** Contributi indipendenti o congiunti di  $z(\text{NPTX2})$  and  $z(\text{Ng})$  al declino del punteggio MMSE durante il periodo di osservazione ( $\Delta\text{MMSE}$ )

| Model                                                                     | Predictor         | $\beta$<br>(95% CI)       | partial $R^2$ | Model $R^2$ | p-values         |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|-------------|------------------|
| $\Delta\text{MMSE} \sim z(\text{NPTX2})$<br>+ MMSE BS + FU                | $z(\text{NPTX2})$ | -1.55<br>(-2.50 to -0.61) | 0.097         | 0.24        | <b>0.001</b>     |
|                                                                           | MMSE BS           | 0.06<br>(-0.31 to 0.43)   | 0.001         |             | 0.759            |
|                                                                           | FU (years)        | 1.03<br>(0.58 to 1.48)    | 0.169         |             | <b>&lt;0.001</b> |
|                                                                           |                   |                           |               |             |                  |
| $\Delta\text{MMSE} \sim z(\text{Ng})$<br>+ MMSE BS + FU                   | $z(\text{Ng})$    | -0.43<br>(-1.39 to 0.53)  | 0.008         | 0.17        | 0.380            |
|                                                                           | MMSE BS           | -0.08<br>(-0.46 to 0.30)  | 0.002         |             | 0.672            |
|                                                                           | FU (years)        | 1.05<br>(0.58 to 1.52)    | 0.162         |             | <b>&lt;0.001</b> |
|                                                                           |                   |                           |               |             |                  |
| $\Delta\text{MMSE} \sim z(\text{NPTX2}) + z(\text{Ng})$<br>+ MMSE BS + FU | $z(\text{NPTX2})$ | -1.95<br>(-3.10 to -0.80) | 0.102         | 0.25        | <b>0.001</b>     |
|                                                                           | $z(\text{Ng})$    | 0.66<br>(-0.46 to 1.78)   | 0.014         |             | 0.243            |
|                                                                           | MMSE BS           | 0.08<br>(-0.29 to 0.45)   | 0.002         |             | 0.665            |
|                                                                           | FU (years)        | 1.02<br>(0.57 to 1.47)    | 0.169         |             | <b>&lt;0.001</b> |
|                                                                           |                   |                           |               |             |                  |

Outcome is  $\Delta\text{MMSE} = \text{MMSE BS} - \text{MMSE FU}$  (positive values indicate cognitive decline).

Models are ordinary least-squares regressions including baseline MMSE and FU duration (years).  $z(\text{NPTX2})$  and  $z(\text{Ng})$  are baseline cohort-standardised values (1 unit = 1 SD).

Significant p-values are in **bold**.

In un modello Cox univariato a rischi proporzionali, valori più elevati di Res\_NPTX2 erano associati a un rischio significativamente inferiore di progressione a demenza AD ( $\beta(\text{SE})=0.46 (0.17)$ , HR=0.63 per incremento di 1 punto; 95% CI 0.45-0.88;  $p=0.007$ ). Nelle analisi di sensitività, il punteggio di MMSE al baseline mostrava un forte effetto protettivo (HR=0.78; 95% CI 0.71-0.87;  $p<0.0001$ ).

Inoltre, un'osservazione importante è che l'aggiunta di Res\_NPTX2 al modello che includeva MMSE BS ha migliorato l'adattamento del modello stesso ( $\Delta\text{AIC}=-3.7$ ; LR  $\chi^2(1)=5.7$ ;  $p=0.017$ ), e Res\_NPTX2 è rimasto indipendentemente associato a un minore rischio di progressione (HR=0.64; 95% CI 0.43-0.93;  $p=0.025$ ) (Tabella 9). L'ispezione visiva dei residui scalati di Schoenfeld non ha mostrato un andamento apprezzabile dipendente dal tempo, supportando quindi il presupposto dei rischi proporzionali.

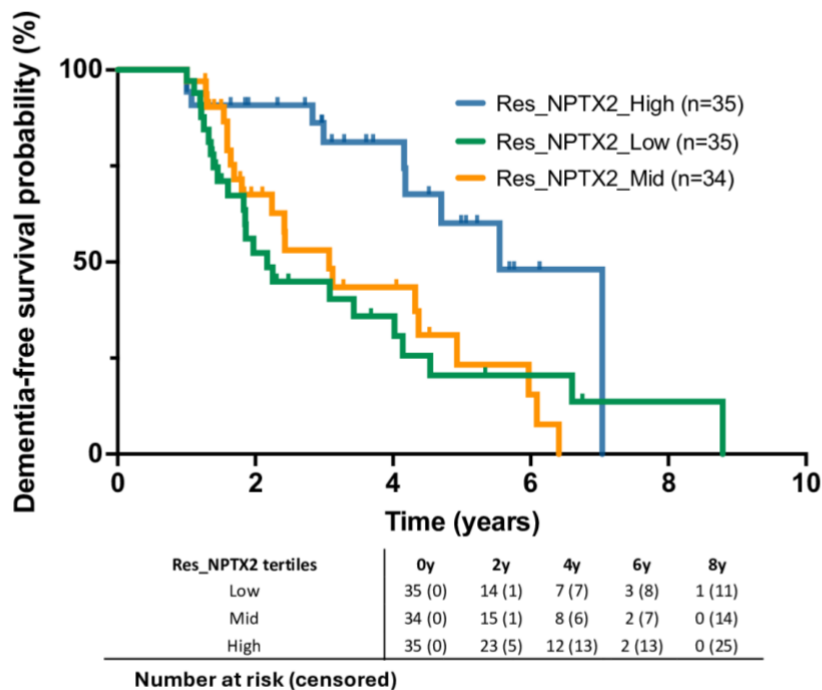
**Tabella 9.** Modelli Cox di regressione per il tempo-alla-progressione a demenza AD

| Model         | Predictors | $\beta$ (SE) | HR   | 95% CI    | AIC   | p-value          |
|---------------|------------|--------------|------|-----------|-------|------------------|
| Main          | Res_NPTX2  | -0.46 (0.17) | 0.63 | 0.45–0.88 | 384.7 | <b>0.007</b>     |
| Sensitivity 1 | MMSE BS    | -0.25 (0.05) | 0.78 | 0.71–0.87 | 372.5 | <b>&lt;0.001</b> |
| Sensitivity 2 | MMSE BS    | -0.22 (0.05) | 0.80 | 0.72–0.89 | 368.8 | <b>&lt;0.001</b> |
|               | Res_NPTX2  | -0.45 (0.20) | 0.64 | 0.43–0.93 |       | <b>0.025</b>     |

Notes: N=104 (events=55; censored=49). Ties=6, handled with the Exact method.

HR indicates hazard ratio per 1-unit increase in the corresponding predictor. 95% CIs are profile-likelihood CIs. Model fit is summarized by the Akaike information criterion (AIC) (lower values indicate better relative support). Significant p-values are in **bold**.

Nell'analisi di sopravvivenza, i terzili di Res\_NPTX2 erano associati al tempo-di-progressione verso la demenza AD (Figura 11; dettagli nella Tabella 11). Le curve di Kaplan-Meier differivano significativamente tra i terzili (log-rank Mantel-Cox  $\chi^2=9.43$ ;  $p=0.009$ ), con l'evidenza di un andamento monotono dal terzile basso a quello alto di Res\_NPTX2 (log-rank test per il trend  $\chi^2=7.86$ ;  $p=0.005$ ).



**Figura 11. Curve di Kaplan-Meier per il tempo-alla-progressione a demenza di Alzheimer tra i terzili di Res\_NPTX2.** Le curve di Kaplan-Meier mostrano la probabilità di rimanere liberi dalla progressione verso la demenza AD nei terzili di Res\_NPTX2 definiti all'interno della coorte MCI: Low ( $\text{Res\_NPTX2} \leq -0.38$ ;  $n = 35$ ), Mid ( $-0.38 < \text{Res\_NPTX2} \leq 0.09$ ;  $n = 34$ ) e High ( $\text{Res\_NPTX2} > 0.09$ ;  $n = 35$ ). I trattini indicano la censura delle osservazioni all'ultima visita di follow-up disponibile. La tabella sotto il grafico riporta il numero di soggetti a rischio (e il numero di osservazioni censurate) a 0, 2, 4, 6 e 8 anni.

Le curve di sopravvivenza differivano significativamente tra i terzili (test log-rank di Mantel-Cox  $\chi^2 = 9.426$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.009$ ), con evidenza di un andamento ordinato (log-rank test for trend  $\chi^2 = 7.858$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.005$ ). Anche il test di Gehan-Breslo-Wilcoxon, che attribuisce un peso maggiore agli eventi precoci, è risultato statisticamente significativo ( $\chi^2 = 9.023$ ,  $df = 2$ ;  $p = 0.011$ ).

**Tabella 10.** Riassunto delle analisi di Kaplan–Meier (KM) e Cox tra i terzili di Res\_NPTX2

| Observation period                              | Model / Test                        | Contrast                            |                      | 95% CI    | p-value                              |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------|--------------------------------------|
| Full follow-up                                  | KM (3 groups)                       | Log-rank (Mantel–Cox)               | $\chi^2=9.43$ (df=2) |           | <b>0.009</b>                         |
|                                                 |                                     | Log-rank test for trend             | $\chi^2=7.86$ (df=1) |           | <b>0.005</b>                         |
|                                                 |                                     | Gehan–Breslow–Wilcoxon <sup>1</sup> | $\chi^2=9.02$ (df=2) |           | <b>0.011</b>                         |
|                                                 | KM pairwise (log-rank) <sup>2</sup> | Mid vs Low                          |                      |           | p=0.965<br>p_adj=0.965               |
|                                                 |                                     | High vs Low                         |                      |           | <b>p=0.003</b><br><b>p_adj=0.006</b> |
|                                                 |                                     | High vs Mid                         |                      |           | <b>p=0.002</b><br><b>p_adj=0.006</b> |
|                                                 | Cox (dummy; Low ref) <sup>3</sup>   | Mid vs Low                          | HR=1.04              | 0.57–1.90 | 0.897                                |
|                                                 |                                     | High vs Low                         | HR=0.35              | 0.16–0.74 | <b>0.006</b>                         |
|                                                 |                                     |                                     |                      |           |                                      |
| <b>≤2y administrative censoring<sup>4</sup></b> | Cox (trend; per tertile)            | per +1 tertile                      | HR=0.50              | 0.30–0.82 | <b>0.006</b>                         |
|                                                 | Cox (dummy; Low ref) <sup>3</sup>   | Mid vs Low                          | HR=0.74              | 0.33–1.63 | 0.452                                |
|                                                 | Cox (dummy; Low ref) <sup>3</sup>   | High vs Low                         | HR=0.18              | 0.05–0.64 | <b>0.008</b>                         |
| <b>&gt;2y landmark<sup>5</sup></b>              | Cox (trend; per tertile)            | per +1 tertile                      | HR=0.79              | 0.50–1.25 | 0.306                                |

<sup>1</sup> Gehan–Breslow–Wilcoxon test gives greater weight to early events.

<sup>2</sup> Pairwise p-values are from two-group Mantel–Cox (log-rank) tests; p\_adj values are Holm–Šidák–adjusted for 3 pairwise comparisons.

<sup>3</sup> Cox dummy model uses tertiles encoded as indicator variables with Low as the reference category (HRs for Mid vs Low and High vs Low).

<sup>4</sup> Administrative censoring sensitivity: follow-up truncated at 2 years, event only for conversions within 2 years (event=1 and time≤2); all others censored at 2 years

<sup>5</sup> 2-year landmark analysis restricted to participants event-free at 2 years (time>2), with time re-indexed from the landmark.

Significant p-values in **bold**.

**Abbreviations:** KM, Kaplan–Meier; Cox, Cox proportional-hazards regression; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; FU, follow-up; df, degrees of freedom;  $\chi^2$ , chi-square statistic; p\_adj, multiplicity-adjusted p value (Holm–Šidák); Low/Mid/High, tertiles of Res\_NPTX2; time\_2y, administratively censored follow-up time truncated at 2 years; event\_2y, event indicator within 2 years; time\_post2, follow-up time re-indexed from the 2-year landmark.

Nei modelli di Cox a rischi proporzionali che consideravano i terzili come variabili categoriche (con il gruppo Low come riferimento), il terzile High mostrava un rischio di progressione marcatamente ridotto rispetto al terzile Low (HR=0.35; 95% CI 0.16-0.74;  $p=0.006$ ), mentre il terzile Mid non differiva da quello Low (HR=1.04; 95% CI 0.57-1.90;  $p=0.897$ ).

I confronti post-hoc log-rank a coppie hanno confermato questo andamento: il terzile High differiva sia dal Low sia dal Mid, mantenendo la significatività dopo la correzione Holm-Šidák ( $p=0.006$  per entrambi), mentre Mid vs Low non risultava significativo ( $p=0.965$ ).

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la differenza di sopravvivenza tra i terzili è guidata principalmente dal gruppo con Res\_NPTX2 High piuttosto che da uno spostamento lineare uniforme tra tutti e tre i gruppi.

Anche il test di Gehan-Breslow-Wilcoxon sulle curve Kaplan-Meier - che attribuisce maggior peso agli eventi precoci - è risultato significativo ( $\chi^2=9.02$ ,  $p=0.011$ ), supportando l'idea di concentrare l'attenzione delle analisi secondarie sulle fasi iniziali del decorso della malattia, cioè entro i primi due anni.

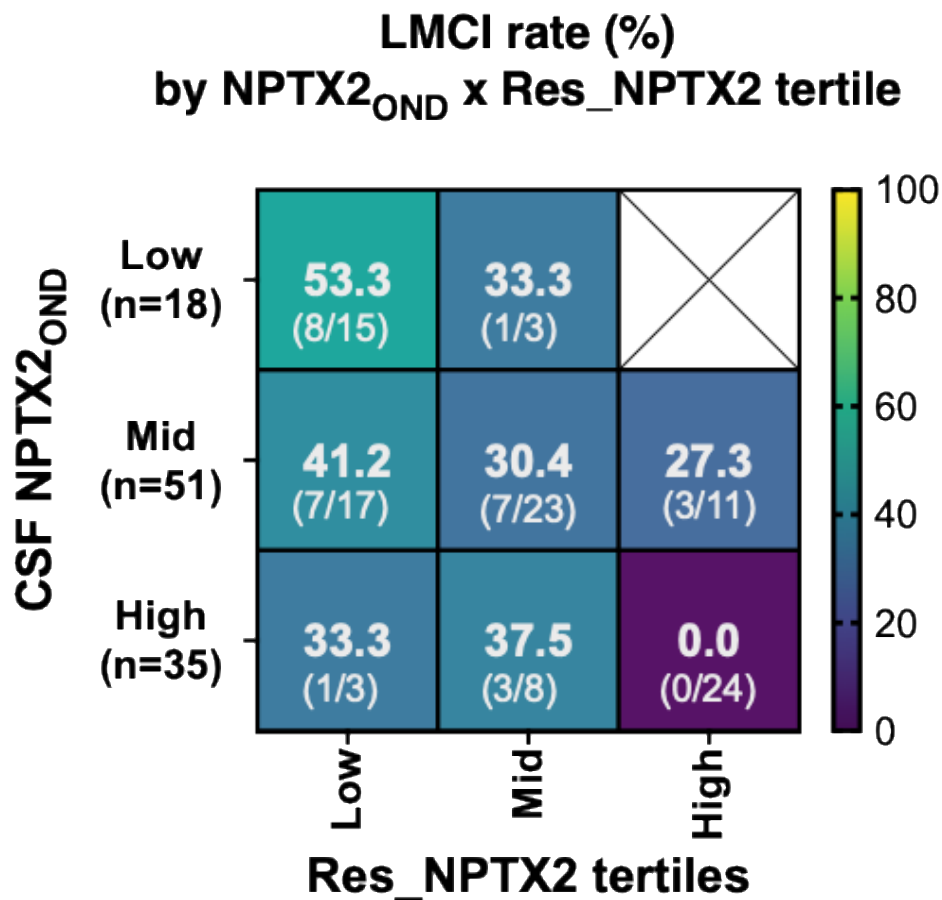
Con la censura amministrativa a 2 anni, la separazione tra terzili è stata mantenuta ed è risultata concentrata nelle fasi iniziali, cioè entro i primi 2 anni (andamento Cox HR=0.50 per terzile,  $p=0.006$ ; High vs Low HR=0.18,  $p=0.008$ ). Invece, dopo un landmark a 2 anni nei partecipanti senza eventi entro quel periodo, l'associazione si attenuava e non risultava più significativa (trend HR=0.79,  $p=0.306$ ) (Tabella 10).

## **6.2 Framework di compensazione a due livelli e traduzione clinica**

Sulla base del livello del framework esplorativo, 18 su 104 pazienti MCI-AD (17.3%) sono stati classificati come Low NPTX2<sub>OND</sub>, 51/104 (49.0%) come Mid NPTX2<sub>OND</sub> e 35/104 (33.7%) come High NPTX2<sub>OND</sub> in base ai valori di riferimento del gruppo OND. La proporzione di soggetti con progressione a breve termine (LMCI) aumentava attraverso i diversi gruppi (High NPTX2<sub>OND</sub>: 4/35, 11.4%; Mid NPTX2<sub>OND</sub>: 17/51, 33.3%; Low NPTX2<sub>OND</sub>: 9/18, 50.0%), evidenziando un'associazione significativa tra la categoria NPTX2<sub>OND</sub> e lo stato di progressione a breve termine ( $\chi^2(2)=9.60$ ,  $p=0.008$ ).

La combinazione di due livelli di fenotipi di compensazione (NPTX2<sub>OND</sub> + Res\_NPTX2) ha delineato una separazione clinica e ha rivelato un pattern strutturato. Raggruppando le diverse combinazioni in tre fenotipi di compensazione, sono emersi chiari gradienti di

rischio: il gruppo High NPTX2<sub>OND</sub> + High Res\_NPTX2 (con compensazione preservata) comprendeva 24 pazienti e nessun soggetto con progressione a breve termine, quindi 0/24 LMCI (0.0%); il gruppo Low NPTX2<sub>OND</sub> + Low Res\_NPTX2 (ovvero fallimento della compensazione) comprendeva 15 pazienti che mostravano la più alta frequenza di progressione (8/15 MCI, 53.3%); mentre il fenotipo intermedio, costituito dalle altre combinazioni (n=65), mostrava 22/65 LMCI  $\leq 2$  anni (33.8%) ( $\chi^2(2)=14.90$ ,  $p=0.0006$ ) (Figura 12).



**Figura 12. Frequenza di LMCI in funzione delle bande di CSF NPTX2<sub>OND</sub> e dei terzili di Res\_NPTX2.** Heatmap che mostra la proporzione di soggetti con progressione a breve termine (LMCI, progressione verso la demenza AD entro 2 anni dal baseline) nella classificazione incrociata 3×3 tra:

- (i) le bande di CSF NPTX2 ancorate al gruppo OND (NPTX2<sub>OND</sub>) (righe con il numero di partecipanti (n) riportato per ciascuna categoria: Low/Mid/High definiti usando la distribuzione del gruppo OND a  $\pm 0.5$  deviazioni standard rispetto alla media del gruppo OND: Low  $\leq 569.5$  pg/mL, High  $\geq 1096.3$  pg/mL, Mid negli altri casi).
- (ii) i terzili di Res\_NPTX2 (colonne: Low/Mid/High, definiti all'interno della coorte MCI-AD).

Ciascuna cella riporta la frequenza di LMCI (%) con il numero di eventi/totale tra parentesi. La cella contrassegnata da una croce indica l'assenza di partecipanti. La scala cromatica rappresenta la frequenza di LMCI (0% - 100%).

Durante l'intera durata del follow-up, gli stessi fenotipi sono rimasti clinicamente distinti: la progressione verso la demenza si è verificata in 2/24 (8.3%) dei soggetti con compensazione preservata, in 42/65 (64.6%) del gruppo intermedio e in 11/15 (73.3%) del terzile con fallimento della compensazione ( $\chi^2(2)=25.22$ ,  $p<0.001$ ) (Tabella 11).

**Tabella 11.** Fenotipi di compensazione a due livelli (categorie di NPTX2 ancorate al gruppo OND + terzili Res\_NPTX2) e outcomes di progressione clinica.

| Phenotype              | Definition                                              | n          | LMCI<br>n (%)    | EMCI<br>n | Progression<br>n (%) |
|------------------------|---------------------------------------------------------|------------|------------------|-----------|----------------------|
| Compensation-preserved | High NPTX2 <sub>OND</sub> band + High Res_NPTX2 tertile | 24         | 0 (0.0)          | 24        | 2 (8.3)              |
| Intermediate           | All other combinations                                  | 65         | 22 (33.8)        | 43        | 42 (64.6)            |
| Compensation-failure   | Low NPTX2 <sub>OND</sub> band + Low Res_NPTX2 tertile   | 15         | 8 (53.3)         | 7         | 11 (73.3)            |
| <b>Total</b>           |                                                         | <b>104</b> | <b>30 (28.8)</b> | <b>74</b> | <b>55 (52.9)</b>     |

**Notes:** LMCI indicates progression to AD dementia within 2 years from baseline. 'Progression' indicates conversion during the whole available follow-up. Association with LMCI across the three phenotypes:  $\chi^2(2)=14.90$ ,  $p=0.0006$ ; Cramer's  $V=0.38$ . Association with overall progression (any time):  $\chi^2(2)=25.22$ ,  $p<0.001$ ; Cramer's  $V=0.49$ .

### 6.3 Analisi voxel-based (VBA) della [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET

Sono stati riscontrati quattro volumi di interesse (VOIs) relativamente ipometabolici nei pazienti MCI-AD, che comprendevano bilateralmente il precuneo, le regioni temporo-parietali e il giro frontale medio, in accordo con il tipico pattern AD di ipometabolismo relativo rispetto alla normalità (Nobili et al., 2018). La corteccia temporale e i giri fusiforme, sopramarginale e angolare, con maggiore estensione nell'emisfero sinistro, erano caratterizzati da differenze significative nell'assorbimento di glucosio nei soggetti LMCI rispetto agli EMCI, identificando così le regioni maggiormente colpite nei pazienti che progredivano verso la demenza in tempi più brevi.

Abbiamo osservato una significativa correlazione diretta tra NPTX2 nel liquor e il metabolismo cerebrale nelle regioni parietali posteriori, in particolare nel precuneo sinistro/corteccia cingolata posteriore (PC/PCC) e nel giro linguale (NPTX2 VOI), in linea con un nostro precedente risultato ottenuto in una coorte più piccola di pazienti MCI-AD (Massa et al., 2024). Tuttavia, dopo l'inclusione di CSF Ng come fattore confondente nel modello di regressione, questo risultato non era più significativo.

Al contrario, una correlazione diretta tra Res\_NPTX2 e metabolismo cerebrale risultava significativa nelle aree fronto-striatali, soprattutto a livello della testa del nucleo caudato, della corteccia cingolata anteriore e del giro frontale dell'emisfero destro (Res\_NPTX2 VOI).

La Tabella 12 riporta in dettaglio l'estensione, le coordinate e le corrispondenti aree di Brodmann dei VOIs, raffigurati in Figura 13.

**Tabella 12.** Regioni cerebrali che risultano significative all'analisi VBA della [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET

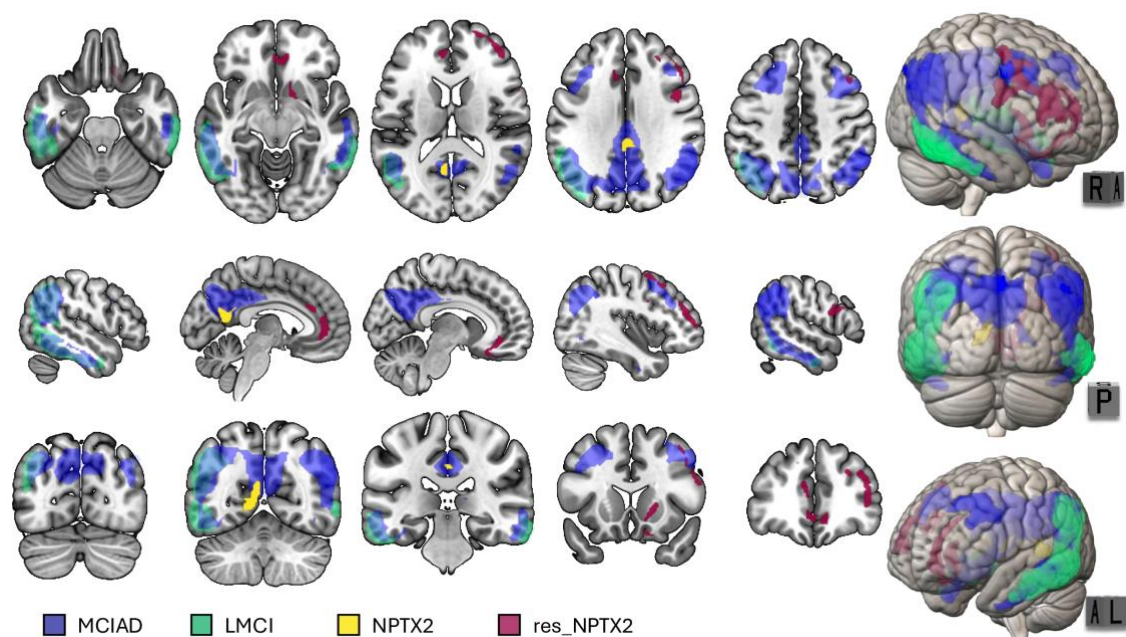
| CTR vs MCI AD              |                        |                           |        |        |                                |    |
|----------------------------|------------------------|---------------------------|--------|--------|--------------------------------|----|
| VOI<br>(Cluster<br>extent) | Peak level p-<br>value | Cluster peaks coordinates |        |        | Cortical region (gyrus)        | BA |
| MCI-AD<br>VOI1<br>(10176)  | p < 0.001              | x                         | y      | z      | Left precuneus                 | 31 |
|                            |                        | -7.08                     | -63.97 | 25.12  |                                |    |
|                            |                        | -36.82                    | -68.42 | 33.21  | Left angular gyrus             |    |
|                            |                        | -1.56                     | -49.62 | 31.98  | Left precuneus                 | 31 |
|                            |                        | 0.28                      | -46.08 | 34.15  | Left precuneus                 | 31 |
|                            |                        | -1.58                     | -40.65 | 36.43  | Left cingulate gyrus           | 31 |
|                            |                        | 5.88                      | -62.18 | 25.51  | Right precuneus                | 31 |
|                            |                        | -47.67                    | -59.16 | 15.88  | Left middle temporal gyrus     | 21 |
|                            |                        | -47.79                    | -52.76 | 27.3   | Left supramarginal gyrus       |    |
|                            |                        | -36.06                    | -31.69 | -15.55 | Left parahippocampal gyrus     | 30 |
|                            |                        | -37.83                    | -22.02 | -18.27 | Left parahippocampal gyrus     | 30 |
|                            |                        | 17.3                      | -48.97 | 5.34   | Right parahippocampal gyrus    | 30 |
|                            |                        | -16.43                    | -57.34 | 34.6   | Left precuneus                 | 31 |
|                            |                        | -37.92                    | -37.27 | -16.11 | Left fusiform gyrus            | 20 |
|                            |                        | 46.58                     | -58.84 | 28.32  | Right superior temporal gyrus  | 39 |
| MCI-AD<br>VOI2<br>(4097)   |                        | 50.87                     | -39.94 | -11.26 | Right fusiform gyrus           | 37 |
|                            |                        | 48.42                     | -46.15 | 33.15  | Right supramarginal gyrus      |    |
|                            |                        | 44.59                     | -52.59 | 41.49  | Right inferior parietal lobule |    |
|                            |                        | 41.96                     | -2.58  | -27.69 | Right middle temporal gyrus    | 21 |
|                            |                        | 39.81                     | -37.67 | -14.83 | Right parahippocampal gyrus    | 30 |
|                            |                        | 39.78                     | -41.57 | -13.4  | Right fusiform gyrus           | 20 |
|                            |                        | 42.7                      | -76.63 | 37.38  | Right precuneus                | 31 |
|                            |                        | 44.59                     | -76.29 | 33.84  | Right angular gyrus            |    |
|                            |                        | 31.76                     | 5.06   | 48.53  | Right middle frontal gyrus     | 6  |
| MCI-AD<br>VOI3             |                        |                           |        |        |                                |    |

| MCI-AD<br>VOI4<br>(1186) | (987)                | 33.86                     | 23.39  | 34.09  | Right middle frontal gyrus    | 9  |
|--------------------------|----------------------|---------------------------|--------|--------|-------------------------------|----|
|                          |                      | 46.6                      | 8.88   | 47.35  | Right middle frontal gyrus    | 6  |
|                          |                      | 50.33                     | 5.49   | 43.48  | Right middle frontal gyrus    | 6  |
|                          |                      | 44.7                      | 10.41  | 51.06  | Right middle frontal gyrus    | 6  |
|                          |                      | 18.81                     | -0.29  | 46.01  | Right cingulate gyrus         | 31 |
|                          |                      | -7.08                     | -63.97 | 25.12  | Left precuneus                | 31 |
|                          |                      | -36.82                    | -68.42 | 33.21  | Left angular gyrus            |    |
|                          |                      | 46.58                     | -58.84 | 28.32  | Right superior temporal gyrus | 39 |
|                          |                      | 50.87                     | -39.94 | -11.26 | Right fusiform gyrus          | 37 |
|                          |                      | 31.76                     | 5.06   | 48.53  | Right middle frontal gyrus    | 6  |
|                          |                      | 33.86                     | 23.39  | 34.09  | Right middle frontal gyrus    | 9  |
|                          |                      | 46.6                      | 8.88   | 47.35  | Right middle frontal gyrus    | 6  |
|                          |                      | -29.28                    | 11.14  | 46.28  | Left middle frontal gyrus     | 6  |
|                          |                      | -36.59                    | 13.74  | 39.19  | Left middle frontal gyrus     | 6  |
| EMCI vs LMCI             |                      |                           |        |        |                               |    |
| Cluster extent           | Cluster Significance | Cluster peaks coordinates |        |        | Cortical region (gyrus)       | BA |
| Cluster 1<br>(6268)      | p < 0.001            | x                         | y      | z      |                               |    |
|                          |                      | -56.54                    | -43.46 | -9.81  | Left middle temporal gyrus    | 21 |
|                          |                      | -51.49                    | -58.15 | 24.92  | Left superior temporal gyrus  | 39 |
|                          |                      | -44.19                    | -64.48 | 31.65  | Left angular gyrus            |    |
|                          |                      | -45.99                    | -64.12 | 28.05  | Left middle temporal gyrus    | 21 |
|                          |                      | -54.5                     | -25.66 | -18.89 | Left inferior temporal gyrus  | 20 |
|                          |                      | -46.06                    | -60.92 | 33.76  | Left angular gyrus            |    |
|                          |                      | -54.47                    | -21.76 | -20.33 | Left inferior temporal gyrus  | 20 |
|                          |                      | -41.61                    | -40.8  | -18.31 | Left fusiform gyrus           | 37 |
|                          |                      | -47.22                    | -44.85 | -15.18 | Left fusiform gyrus           | 37 |
| Cluster 2<br>(1319)      |                      | -51.48                    | -47.15 | 27.77  | Left supramarginal gyrus      |    |
|                          |                      | -46.89                    | -0.43  | -27.19 | Left middle temporal gyrus    | 21 |
|                          |                      | 60.17                     | -37.78 | -14.5  | Right middle temporal gyrus   | 21 |
|                          |                      | 60.25                     | -24.39 | -16.83 | Right inferior temporal gyrus | 20 |
|                          |                      | 53.01                     | -6.71  | -24.29 | Right fusiform gyrus          | 20 |
| Cluster 3<br>(1333)      |                      | 47.14                     | -51.1  | -12.38 | Right fusiform gyrus          | 37 |
|                          |                      | 54.39                     | -55.91 | -1.9   | Right middle temporal gyrus   | 21 |
|                          |                      | 50.18                     | -54.14 | 37.83  | Right supramarginal gyrus     |    |
|                          |                      | 48.47                     | -62.22 | 24.43  | Right middle temporal gyrus   | 21 |
|                          |                      | 44.67                     | -66.63 | 31.15  | Right angular gyrus           |    |
| CSF NPTX2                |                      |                           |        |        |                               |    |
| Cluster extent           | Cluster Significance | Cluster peaks coordinates |        |        | Cortical region (gyrus)       | BA |
| NPTX2-<br>VOI<br>(345)   | p < 0.001            | x                         | y      | z      |                               |    |
|                          |                      | -3.31                     | -37.91 | 27.66  | Left cingulate gyrus          | 31 |
|                          |                      | -15.99                    | -57.76 | 0.34   | Left lingual gyrus            | 19 |
|                          |                      | -1.51                     | -29.12 | 33.92  | Left cingulate gyrus          | 31 |
|                          |                      | -12.28                    | -54.05 | 0.75   | Left lingual gyrus            | 19 |
|                          |                      | -8.65                     | -54.59 | 6.17   | Left posterior cingulate      | 30 |
|                          |                      | -5.12                     | -48.55 | 21.21  | Left posterior cingulate      | 30 |
|                          |                      | -5.08                     | -51.93 | 17.29  | Left posterior cingulate      | 30 |
|                          |                      | -10.76                    | -65.64 | 23.1   | Left precuneus                | 31 |
| Res NPTX2                |                      |                           |        |        |                               |    |
| Cluster extent           | Cluster Significance | Cluster peaks coordinates |        |        | Cortical region (gyrus)       | BA |

|                    |           | x     | y     | z      |                              |    |
|--------------------|-----------|-------|-------|--------|------------------------------|----|
| Cluster 1<br>(605) | p < 0.002 | -8.52 | 32.28 | 21.6   | Left anterior cingulate      |    |
|                    |           | 11.99 | 11.38 | 3.76   | Right caudate                |    |
|                    |           | -8.44 | 36.53 | 16.6   | Left anterior cingulate      |    |
|                    |           | -6.79 | 22.26 | 27.89  | Left cingulate gyrus         | 32 |
|                    |           | 10.19 | 11.74 | 0.16   | Right caudate                |    |
|                    |           | 12.23 | 14.99 | -13.91 | Right subcallosal gyrus      |    |
|                    |           | -8.73 | 16.15 | 32.69  | Left cingulate gyrus         | 32 |
|                    |           | 12.27 | 18.89 | -15.35 | Right medial frontal gyrus   | 25 |
|                    |           | 8.44  | 34.46 | -1.32  | Right anterior cingulate     | 24 |
|                    |           | 4.77  | 27.37 | -5.66  | Right anterior cingulate     | 24 |
|                    |           | 8.41  | 12.27 | -5.23  | Right caudate                |    |
|                    |           | 8.62  | 32.12 | -15.96 | Right medial frontal gyrus   | 9  |
| Cluster 2<br>(875) |           | 35.98 | 47.3  | 20.18  | Right middle frontal gyrus   | 6  |
|                    |           | 35.85 | 40.84 | 28.57  | Right middle frontal gyrus   | 6  |
|                    |           | 37.51 | 1.01  | 32.03  | Right inferior frontal gyrus | 46 |
|                    |           | 37.18 | 0.43  | 57.2   | Right middle frontal gyrus   | 6  |
|                    |           | 43.01 | 18.91 | 41.03  | Right middle frontal gyrus   | 6  |
|                    |           | 19.3  | 54.49 | 24.18  | Right superior frontal gyrus | 10 |
|                    |           | 22.99 | 52.61 | 24.06  | Right superior frontal gyrus | 10 |
|                    |           | 21.09 | 50.41 | 27.43  | Right superior frontal gyrus | 10 |
|                    |           | 50.55 | 8.92  | 27.6   | Right inferior frontal gyrus | 46 |
|                    |           | 48.66 | 10.44 | 31.31  | Right middle frontal gyrus   | 6  |
|                    |           | 31.76 | 16.06 | 51.38  | Right superior frontal gyrus | 8  |
|                    |           | 46.79 | 14    | 33.42  | Right middle frontal gyrus   | 6  |
|                    |           | 39.75 | 36.8  | 12.04  | Right inferior frontal gyrus | 46 |
|                    |           | 29.97 | 22.01 | 48.31  | Right superior frontal gyrus | 8  |

Peak coordinates and cortical regions in each cluster are ordered downwards from the highest peak Z-score.

All clusters contained  $\geq 100$  voxels and were significant at  $p < 0.05$  FWE-corrected for multiple comparisons at cluster-level. Abbreviations: BA, Brodmann area; HC, healthy controls; MCI-AD, Mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease; EMCI, Early mild cognitive impairment; LMCI, Late mild cognitive impairment; VOI, volumes of interest; NPTX2, neuronal pentraxin-2; Res\_NPTX2, residual NPTX2 component (as defined in the main text).



**Figura 13. Analisi VBA.** La rappresentazione bidimensionale (sezioni assiali, coronali e sagittali) e la ricostruzione tridimensionale mostrano il correlato metabolico di NPTX2 e Res\_NPTX2 (rispettivamente in giallo e burgundy) sovrapposto all'atlante di riferimento MNI (usando il software MRICroGL, <https://www.nitrc.org/projects/mricrogl>). La loro relazione spaziale può essere valutata in riferimento a:

- i) le VOIs correlate a MCI-AD (in blu), derivate dal confronto tra MCI-AD e i gruppi HC
- ii) le regioni relativamente ipometaboliche nei pazienti LMCI rispetto a quelli EMCI (in verde), che individuano l'emisfero più affetto (ovvero quello sinistro) nei pazienti che progrediscono a demenza in un intervallo di tempo più breve.

Abbreviazioni: HC, controlli sani; MCI-AD, Mild cognitive impairment dovuto a malattia di Alzheimer; EMCI, early mild cognitive impairment; LMCI, late mild cognitive impairment; VOI, volume di interesse; NPTX2, neuronal pentraxin-2; Res\_NPTX2, componente residua di NPTX2 (come definita nel testo).

## 7. Discussione

I tassi di deterioramento cognitivo mostrano una notevole variazione tra gli individui con AD in fase prodromica, mentre i biomarcatori *core* amiloide-tau da soli non spiegano completamente questa eterogeneità (Jack Jr. et al., 2024). L'alterazione sinaptica emerge come un plausibile substrato biologico della capacità adattativa e della resilienza clinica, che all'interno di un quadro compensatorio possono essere interpretate come la capacità di mantenere la funzione cognitiva o ritardare la progressione clinica nonostante la patologia AD (Arenaza-Urquijo e Vemuri, 2020). In questo lavoro, ci siamo posti l'obiettivo di di operationalizzare questo concetto integrando due marcatori sinaptici liquorali con un significato biologico complementare: Neurogranina (Ng), una proteina postsinaptica ampiamente interpretata come indice di danno sinaptico correlato all'AD (Portelius et al., 2015; Wellington et al., 2016), e Pentrassina Neuronale-2 (NPTX2), una proteina sinaptica coinvolta nel rimodellamento sinaptico dipendente dall'attività e nell'omeostasi delle reti neuronali (Xiao et al., 2017; Galasko et al., 2019; Gómez de San José et al., 2022; Nilsson et al., 2021; Sathe et al., 2021; Libiger et al., 2021; Llano et al., 2023; Soldan et al., 2023). I nostri risultati mostrano che l'estrazione di una componente residua di CSF NPTX2 (Res\_NPTX2) - definita rispetto all'età, ai valori di CSF Ng e a un indice *core* di burden dell'AD - fornisce una misura operativa delle differenze interindividuali nelle traiettorie cognitive. È importante sottolineare che, combinando pTau181 con il rapporto A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, l'indice di burden AD catturava la fisiopatologia correlata alla tau rispetto all'alterazione dell'amiloide, mantenendo allo stesso tempo la maggiore interpretabilità del rapporto A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 rispetto al valore A $\beta$ 42 considerato singolarmente. Questo indice è stato utilizzato come una pragmatica variabile di aggiustamento per sintetizzare la patologia *core* dell'AD in un modello di residualizzazione, e non come nuovo biomarcatore diagnostico o di stadiazione.

La nostra prima osservazione chiave è la conferma che NPTX2 fosse l'unico biomarcatore nel CSF, tra quelli esaminati, in grado di discriminare significativamente i pazienti EMCI da quelli LMCI, definiti in base alla prossimità temporale alla demenza. Al contrario, i valori di CSF Ng erano solo nominalmente più elevati nei soggetti EMCI rispetto ai LMCI, e non rimanevano significativi dopo la correzione per confronti multipli. Questo risultato replica la nostra precedente osservazione (Massa et al., 2024) in una coorte parzialmente

sovrapponibile e quasi raddoppiata, e supporta evidenze emergenti che correlano livelli relativamente preservati o aumentati di NPTX2 a un minor rischio di progressione (Anderson et al., 2025; Oh et al., 2025), mettendo quindi in discussione l'ipotesi di un declino monotono di NPTX2 liquorale lungo il decorso dell'AD parallelo al deterioramento cognitivo (Gómez de San José et al., 2022).

La motivazione per isolare una componente residua di CSF NPTX2 deriva dalla sua sostanziale collinearità con Ng, una relazione riportata costantemente negli studi sul CSF (Portelius et al., 2015; Galasko et al., 2019; Nilsson et al., 2021). Anziché considerare questa collinearità come una limitazione, ci siamo posti esplicitamente una domanda diversa, cioè se esista una componente di NPTX2 non spiegata dal solo danno sinaptico, ma che rifletta invece il rimodellamento sinaptico adattativo e la capacità di rete, interpretabile all'interno di un quadro compensatorio. Questa distinzione concettuale è in linea con recenti lavori proteomici su larga scala che hanno dimostrato come firme sinaptiche centrate su NPTX2 catturino dimensioni clinicamente significative della resilienza cognitiva oltre al burden di amiloide e tau (Oh et al., 2025).

Questa premessa è supportata nel nostro studio dalle analisi di correlazione e basate sulla suddivisione rispetto alla mediana di Ng e NPTX2, che hanno evidenziato sia una varianza condivisa sia una dissociazione significativa. Sebbene i due marcatori mostrino un comportamento in gran parte concordante, la più alta proporzione di pazienti vicini alla progressione a demenza (LMCI) era concentrato nel gruppo con bassi livelli di NPTX2, indipendentemente dai livelli di Ng. Al contrario, valori più elevati di CSF NPTX2 - indipendentemente da Ng - erano associati a una minore proporzione di pazienti prossimi alla progressione clinica (LMCI). Questi pattern indicano che la NPTX2 liquorale fornisce informazioni clinicamente rilevanti che non si limitano al danno sinaptico. In uno scenario simile, il segnale residuo – e non la concentrazione assoluta - diventa la misura principale della capacità adattativa di rete correlata a NPTX2 all'interno del quadro compensatorio proposto. Concettualmente, due individui possono mostrare livelli comparabili di danno sinaptico (ad esempio, valori di Ng simili), ma differire sostanzialmente nella loro capacità di adattamento compensatorio di rete, qui rappresentata da valori più alti o più bassi di NPTX2 rispetto al danno sinaptico, al burden patologico di AD e all'età. Queste covariate sono state incluse esplicitamente nel modello di regressione per minimizzare i fattori confondenti, e tutti i predittori sono stati trasformati sotto forma di z-score per gestire le

differenze di scala. È importante sottolineare che Ng è emerso come l'unico predittore significativo di  $z(\text{NPTX2})$ , mentre età e burden AD non lo erano, supportando ulteriormente l'interpretazione secondo cui la varianza condivisa tra CSF NPTX2 e Ng rifletta il danno sinaptico, mentre il residuo catturi una dimensione biologica aggiuntiva.

Coerentemente con questa interpretazione, Res\_NPTX2 risultava più elevato nei pazienti EMCI rispetto ai LMCI e mostrava un'associazione significativa con migliori prestazioni cognitive al baseline e al follow-up, oltre che con un minor tasso di declino cognitivo misurato tramite  $\Delta\text{MMSE}$ . Fondamentalmente, queste associazioni rimanevano robuste dopo aggiustamento per MMSE al baseline e per la durata del follow-up, indicando che Res\_NPTX2 non è semplicemente un indice dello stato cognitivo iniziale o della durata di malattia. Nelle analisi di sensibilità che modificavano direttamente i valori dei marcatori sinaptici, solo NPTX2 - ma non Ng - risultava associata indipendentemente al declino cognitivo longitudinale, sostenendo l'idea che NPTX2 catturi una dimensione prognosticamente rilevante della funzione sinaptica che va oltre i processi correlati al danno, e che può essere rappresentata dall'indice Res\_NPTX2.

Le analisi in merito al tempo di progressione a demenza hanno fornito l'evidenza più forte del valore prognostico di Res\_NPTX2, mostrando che livelli più elevati erano associati a un minor rischio di progressione verso la demenza e aggiungevano un valore incrementale rispetto allo stato cognitivo basale (MMSE BS). Questo pattern era ulteriormente sostenuto da analisi basate sui terzili di Res\_NPTX2, in cui i pazienti nel terzile più alto mostravano una progressione verso la demenza significativamente ritardata in confronto a quelli nei terzili intermedio o più basso, che presentavano traiettorie ampiamente sovrapponibili. Le analisi hanno costantemente indicato un gradiente di Res\_NPTX2 ordinato dai valori bassi a quelli alti, con differenze tra gruppi guidate prevalentemente dagli eventi di progressione precoce. Le analisi dei diversi periodi di follow-up hanno fornito ulteriori dettagli in merito all'interpretazione clinica. L'effetto protettivo derivante dai livelli più elevati di Res\_NPTX2 risultava accentuato tramite la censura amministrativa a due anni, mentre le analisi dei landmark oltre i due anni non mostravano associazioni significative.

Dal punto di vista meccanicistico, le pentraxine neuronali partecipano all'adattamento omeostatico dei circuiti neuronali in risposta a cambiamenti prolungati dell'attività, agendo per ristabilire l'equilibrio tra eccitazione e inibizione (Chang et al., 2010; Xiao et al., 2017; Gómez de San José et al., 2022). L'espressione genica di NPTX2 è regolata dall'attività

neuronale e dalle richieste di plasticità sinaptica, e il suo rilascio promuove la stabilizzazione dei recettori AMPA contenenti GluA4 nelle sinapsi eccitatorie sugli interneuroni parvalbumina-positivi, supportando così il controllo dell'eccitabilità e della ritmicità a livello dei circuiti neuronali (Chang et al., 2010; Xiao et al., 2017, 2021). Oltre all'adattamento sinaptico, NPTX2 è implicata nella regolazione neuro immunitaria, attraverso il legame con la componente C1q del complemento e la limitazione dell'eliminazione sinaptica mediata dal complemento, fornendo un collegamento meccanicistico tra compensazione sinaptica e protezione dall'eccessivo pruning microgliale (Zhou et al., 2023). All'interno di questo quadro biologico, la compensazione sinaptica indicizzata da NPTX2 - e più specificamente dalla componente Res\_NPTX2 - può essere concettualizzata come un meccanismo tampone intrinsecamente limitato nel tempo, capace di ritardare la progressione clinica finché i processi omeostatici compensatori non vengono progressivamente sopraffatti dall'accumulo della patologia AD.

Un secondo contributo di questo studio consiste nell'esplorazione di un framework interpretabile che consenta la stratificazione dei pazienti. Sottolineiamo che questo approccio esplorativo non ha lo scopo di definire un biomarcatore diagnostico da impiegare in pratica clinica, ma piuttosto di proporre un modello per profilare i pazienti in base al rischio di progressione e per approfondire l'interpretazione biologica. Mettendo i valori di CSF NPTX2 in rapporto alla distribuzione di una coorte di controllo non affetta da demenza (OND), abbiamo definito gruppi clinicamente interpretabili di NPTX2 riferiti a un comparatore esterno. Fondamentalmente, la classificazione incrociata dei gruppi NPTX2<sub>OND</sub> con i terzili di Res\_NPTX2 ha ulteriormente affinato la stratificazione del rischio in fenotipi presumibilmente correlati alla compensazione. In particolare, nessun paziente con basso NPTX2<sub>OND</sub> ha mostrato alti valori di Res\_NPTX2. Ancora più degno di nota, nessuno dei 24 pazienti caratterizzati sia da alto NPTX2<sub>OND</sub> sia da alto Res\_NPTX2 è andato incontro a progressione a demenza entro due anni a partire dallo stadio MCI, evidenziando un sottogruppo con rischio a breve termine particolarmente basso. Questa architettura bidimensionale fornisce un modo concreto e intuitivo per esprimere come il danno sinaptico e la capacità compensatoria rappresentino dimensioni biologiche distinte che, quando sono considerate congiuntamente, possono offrire una caratterizzazione più dettagliata della sinaptopatia nell'AD.

Questa interpretazione basata sui residui non è soltanto un costrutto statistico, ma è coerente con un plausibile modello biologico. Livelli preservati o relativamente aumentati di CSF NPTX2 nelle fasi prodromiche precoci dell'AD possono riflettere una risposta sinaptica adattativa compatibile con meccanismi correlati alla compensazione, coerentemente con studi che mostrano come NPTX2 manifesti un comportamento differente rispetto ai classici marcatori di danno sinaptico e consenta di delineare dimensioni della resilienza cognitiva al di là del burden di amiloide e tau (Nilsson et al., 2024; Anderson et al., 2025; Oh et al., 2025; Planalp et al., 2025). Più in generale, recenti evidenze su altre pentrassine neuronali supportano ulteriormente la rilevanza di questa via sinaptica nell'AD: i livelli di CSF NPTX1 e NPTXR diminuiscono progressivamente con la gravità della malattia, correlano con l'assottigliamento corticale e il deterioramento cognitivo, e predicono la successiva progressione verso la demenza, rafforzando l'ipotesi secondo cui la famiglia delle pentraxine neuronali catturi aspetti clinicamente significativi del funzionamento sinaptico lungo il continuum dell'AD (Dai et al., 2026).

Evidenze convergenti hanno identificato le reti frontali anteriori destre come principali substrati della riserva cognitiva e della resilienza nell'AD (Morbelli et al., 2013; Robertson, 2014; Brosnan et al., 2018; Massa et al., 2022). Al contrario, le regioni temporo-parietali sinistre sono tra i bersagli metabolici più precoci e vulnerabili della malattia (Lubben et al., 2021). In linea con questo, i pazienti LMCI mostravano una captazione di glucosio inferiore rispetto ai soggetti con EMCI nelle cortecce temporo-parietali, con una maggiore estensione nell'emisfero sinistro. È interessante notare che i livelli di CSF NPTX2 erano direttamente correlati al metabolismo nelle regioni parietali posteriori sinistre, in particolare nelle aree PC/PCC, ma questa associazione non risultava più significativa dopo l'aggiustamento per Ng. Ciò suggerisce che il segnale NPTX2-FDG nelle regioni posteriori si sovrapponga notevolmente al burden di danno sinaptico correlato a Ng, in linea con precedenti evidenze che hanno localizzato i correlati metabolici specifici di Ng a livello di precuneo e corteccia cingolata posteriore (PC/PCC) nel MCI-AD (Massa et al., 2022).

Al contrario, Res\_NPTX2 era associato al metabolismo in regioni fronto-striatali lateralizzate a destra, parzialmente al di fuori del canonico pattern di ipometabolismo posteriore dell'AD. Questa dissociazione emisferica e topografica è biologicamente informativa. Il pattern posteriore con predominanza dell'emisfero sinistro identifica il territorio metabolicamente più vulnerabile nei pazienti più vicini alla progressione a

demenza, mentre il pattern fronto-striatale destro è indice di un sistema distinto più compatibile con un reclutamento compensatorio. Una possibilità è che questo pattern rappresenti la preservazione dei circuiti coinvolti nel controllo esecutivo o legati alla salienza, che tamponano temporaneamente l'espressione clinica della patologia. Un'altra possibilità è che rifletta un marcatore più generale dello stadio di malattia o dell'efficienza di rete. Questa interpretazione è in linea con i modelli di riserva e resilienza nell'AD, secondo cui le regioni frontali destre - in particolare la corteccia prefrontale dorsolaterale destra - consentono il controllo esecutivo e l'attenzione sostenuta quando le reti cerebrali diventano progressivamente disconnesse (Robertson, 2014; Brosnan et al., 2018). Nei soggetti che convertono più tardivamente, una preservata efficienza fronto-striatale può parzialmente proteggere la performance cognitiva dall'aumento progressivo del carico patologico (Bauckneht et al., 2018; Ewers et al., 2021). Fondamentalmente, questo meccanismo compensatorio è tempo- dipendente. Le alterazioni nella stabilità sinaptica e nell'equilibrio eccitazione-inibizione possono condurre a modificazioni dinamiche della connettività cerebrale nell'AD, da una iniziale relativa iperconnettività a una successiva ipoconnettività con la progressione della neurodegenerazione (Pini et al., 2026). In questo quadro, Res\_NPTX2 potrebbe essere l'indicatore di una fase limitata nel tempo in cui il reclutamento dei circuiti fronto-striatali destri rimane clinicamente efficace prima che i meccanismi compensatori si esauriscano progressivamente.

Una obiezione prevedibile è che la residualizzazione possa apparire inutilmente complessa, soprattutto considerando che i valori assoluti di NPTX2 nel liquido cerebrospinale possono consentire una capacità discriminativa comparabile tra EMCI e LMCI, e che le metriche basate sui residui sono intrinsecamente dipendenti dalla coorte. Tuttavia, coerentemente con la natura meccanicistica dello studio, il valore aggiunto di Res\_NPTX2 risiede nella sua interpretabilità meccanicistica. Catturando la componente di NPTX2 indipendente dal danno sinaptico e più strettamente associata a un ritardo nella progressione clinica, questo approccio fornisce un collegamento biologicamente interpretabile tra meccanismi molecolari sinaptici e meccanismi di resilienza/compensazione. Nel contesto dei recenti criteri NIA-AA, che enfatizzano il ruolo delle misurazioni basate sulla tau per la stadiazione biologica (Jack Jr. et al., 2024), i nostri risultati forniscono una metrica complementare che mette in luce l'eterogeneità interindividuale nelle traiettorie cliniche tra pazienti con un carico patologico AD comparabile.

Questo studio presenta molteplici punti di forza, tra cui una coorte clinicamente ben caratterizzata con diagnosi di MCI-AD, supportata dai biomarcatori e in linea con i criteri diagnostici attuali (Albert et al., 2011; Jack Jr. et al., 2024), metodi statistici robusti con analisi di sensibilità e correzione per confronti multipli. La correlazione delle bande di NPTX2 a un gruppo di riferimento esterno ha ulteriormente limitato la circolarità delle analisi sul gruppo dei pazienti e ha consentito un framework compensatorio a due livelli, che consente una migliore interpretabilità biologica e clinica. Un ulteriore punto di forza consiste nella disponibilità dei dati [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET. Questo livello di imaging traslazionale arricchisce lo studio fornendo un supporto fondato su basi anatomiche all'interpretazione meccanicistica proposta, in particolare alla distinzione tra i segnali delle regioni posteriori associati alla vulnerabilità e un pattern fronto-striatale legato ai processi compensatori di rete. In questo senso, i risultati di imaging rafforzano la plausibilità biologica di Res\_NPTX2 come un marcatore della capacità adattativa a livello delle reti cerebrali.

Le limitazioni includono il disegno retrospettivo monocentrico e la necessità di validazione in coorti più ampie comprendenti soggetti lungo l'intero spettro cognitivo, dagli individui cognitivamente indenni ai pazienti con demenza. È importante sottolineare che l'interpretazione compensatoria rimane inferenziale. Il disegno osservazionale proposto può identificare pattern biomolecolari e metabolici compatibili con una capacità adattativa di rete, ma non consente di dimostrare una compensazione attiva o il reclutamento causale di circuiti compensatori. Inoltre, i costrutti basati sui residui sono intrinsecamente dipendenti dal modello statistico, e gli outcome cognitivi si sono basati sul punteggio MMSE e sulla progressione clinica, che potrebbero avere una sensibilità limitata nel rilevare cambiamenti sottili. Infine, sebbene sia stata effettuata una correzione per età e burden AD, non sono stati esplicitamente considerati altri fattori modificatori - come la riserva cognitiva (Arenaza-Urquijo e Vemuri, 2020), i fattori genetici e le co-patologie - e potrebbero consentire di perfezionare l'interpretazione in dataset più ampi. Come previsto per un indicatore convenzionale di riserva cognitiva, il livello di istruzione era associato al punteggio MMSE al baseline, ma non alle misure cognitive longitudinali o ai biomarcatori nel liquido cerebrospinale. Ciò supporta l'ipotesi che Res\_NPTX2 catturi una dimensione biologica più prossima alla capacità adattativa sinaptica/di rete, piuttosto che una riserva cognitiva legata esclusivamente all'istruzione.

## 8. Osservazioni conclusive e prospettive future

Nei casi di MCI-AD confermati tramite i biomarcatori, NPTX2 nel liquido cerebrospinale (CSF) fornisce informazioni prognostiche aggiuntive rispetto ai tradizionali marcatori di neurodegenerazione, in particolare in merito alla sinaptopatia e alla capacità adattiva di rete. Livelli più elevati di questa proteina sinaptica, infatti, sono correlati a una migliore performance cognitiva e a una minor probabilità di progressione a demenza nel breve termine, come si evince anche dalla minor frequenza di soggetti late MCI (LMCI). Neurogranina (Ng), invece, seppur condivida con NPTX2 una quota di covarianza legata alla sinaptopatia, non mostra la stessa capacità discriminativa rispetto alla vicinanza alla progressione clinica, risultando quindi un indicatore più strettamente associato al danno sinaptico ma meno predittivo sull'andamento cognitivo.

Tramite la strategia statistica di residualizzazione, è stata isolata una componente di NPTX2 liquorale legata alla capacità adattiva di network, indipendente dalla varianza condivisa con il danno sinaptico (rappresentato da Ng), il burden patologico dell'AD e l'età. Res\_NPTX2 è risultato significativamente più elevato nei pazienti EMCI rispetto ai LMCI, e ha mostrato un'associazione significativa con MMSE sia al baseline sia al follow-up e a una minore variazione di tale punteggio nel tempo (e quindi a un minore declino cognitivo), oltre ad essere protettiva circa il tempo di progressione a demenza (ben evidente osservando le curve di Kaplan-Meier).

Un importante supporto all'interpretazione biologica dei risultati è stato poi fornito dalla [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET, le cui immagini sono state analizzate con la tecnica voxel-based (VBA). È stato così confermato il coinvolgimento preferenziale dell'emisfero sinistro, in particolare delle regioni temporo-parietali, nei pazienti LMCI. Questo ha identificato quindi l'emisfero sinistro come il più severamente affetto nelle fasi iniziali e associato al sottogruppo dei pazienti più vicini temporalmente alla progressione a demenza. Al contrario, valori più elevati di Res\_NPTX2 risultavano associati a un pattern metabolico fronto-striatale destro, che supporta dunque un segnale di possibile adattamento/compenso di network nel contesto dell'emisfero meno severamente affetto ed in un circuito più anteriore, generalmente coinvolto dalla patologia AD solo nelle fasi più avanzate di patologia. Questi risultati suggeriscono che, proponendola all'interno di un quadro compensatorio, Res\_NPTX2 possa rappresentare un indice biologico della capacità adattiva delle reti neurali di fronte al danno

neurodegenerativo. Questa proteina sinaptica contiene quindi un significato intrinseco di funzionamento sinaptico e possibilmente di resilienza cerebrale, maggiormente correlati al profilo clinico dei pazienti.

Da notare come l'elaborazione di questo costrutto statistico non sia finalizzata a una sua applicazione in un contesto clinico o a sostituire altri marcatori attualmente maggiormente validati, quanto piuttosto a isolare e comprendere in modo meccanicistico una componente di NPTX2 che trascenda la mera degenerazione ed il danno sinaptico, e sia più vicina alla funzione.

Nel complesso, i dati ottenuti sostengono un modello interpretativo in cui NPTX2 nel liquido cerebrospinale (CSF) emerge come un promettente fattore complementare ai biomarcatori *core* della malattia di Alzheimer (AD). Infatti, non si configura esclusivamente come indicatore di integrità sinaptica, ma fornisce informazioni biologicamente interpretabili sul rischio di progressione a demenza nel breve termine e sui meccanismi compensatori responsabili dell'eterogeneità clinicamente rilevante della malattia, rivestendo dunque un potenziale per il monitoraggio prognostico delle diverse traiettorie cliniche e la stadiazione dei pazienti.

In futuro potrebbe essere interessante validare questi risultati tramite studi longitudinali su coorti di pazienti più ampie e lungo l'intero continuum della malattia di Alzheimer, con l'obiettivo di caratterizzare in maniera più accurata l'eterogeneità clinica dei pazienti fin dalle fasi iniziali, essenziale per la stratificazione dei pazienti in base al rischio di progressione e le implicazioni terapeutiche.

## Bibliografia

- 2020 Alzheimer's disease facts and figures. (2020). *Alzheimer's and Dementia*, 16(3), 391–460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>
- Abrous, D. N., Blin, N., Boraxbekk, C. J., Catheline, G., Fitzsimons, C. P., Hilscher, M., Lemoine, M., Lopes, L. V., Maass, A., Nilsson, M., Nyberg, L., Rasmussen, L. J., Remondes, M., Sauvage, M., Schreiber, S., & Wolbers, T. (2026). Hallmarks of healthy cognitive aging: Inter-individual differences in aging trajectories. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 119). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2026.103102>
- Aisen, P. S., Cummings, J., Jack, C. R., Morris, J. C., Sperling, R., Frölich, L., Jones, R. W., Dowsett, S. A., Matthews, B. R., Raskin, J., Scheltens, P., & Dubois, B. (2017). On the path to 2025: Understanding the Alzheimer's disease continuum. In *Alzheimer's Research and Therapy* (Vol. 9, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0283-5>
- Aisen, P. S., Petersen, R. C., Donohue, M. C., Gamst, A., Raman, R., Thomas, R. G., Walter, S., Trojanowski, J. Q., Shaw, L. M., Beckett, L. A., Jack, C. R., Jagust, W., Toga, A. W., Saykin, A. J., Morris, J. C., Green, R. C., & Weiner, M. W. (2010). Clinical core of the Alzheimer's disease neuroimaging initiative: Progress and plans. *Alzheimer's & Dementia*, 6(3), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2010.03.006>
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holtzman, D. M., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Snyder, P. J., Carrillo, M. C., Thies, B., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 7(3), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>
- Anderson, C. L., Gross, A. L., Pettigrew, C., Vazquez, J. P., Moghekar, A., Oh, S., Na, C. H., Albert, M., Worley, P., & Soldan, A. (2025). Cognitive resilience in preclinical Alzheimer's disease: Higher NPTX2 and VGF levels are associated with reduced cognitive decline. *Neurobiology of Aging*, 156, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2025.09.002>
- Arenaza-Urquijo EM, Vemuri P (2020) Improving the resistance and resilience framework for aging and dementia studies. *Alzheimers Res Ther* 12:41. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00609-2>
- Ausó, E., Gómez-Vicente, V., & Esquivia, G. (2020). Biomarkers for Alzheimer's Disease Early Diagnosis. *Journal of Personalized Medicine*, 10(3), 114. <https://doi.org/10.3390/jpm10030114>
- Barthel, H., & Sabri, O. (2017). Clinical use and utility of amyloid imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 58(11), 1711–1717. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185017>
- Bauckneht M, Chincarini A, Piva R, et al (2018) Metabolic correlates of reserve and resilience in MCI due to Alzheimer's Disease (AD) Rik Ossenkoppele. *Alzheimers Res Ther* 10:. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0366-y>
- Bhembre, N., Bonthron, C., & Opazo, P. (2023). Synaptic Compensatory Plasticity in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 43(41), 6833–6840. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-23.2023>

- Blennow, K., Diaz-Lucena, D., Zetterberg, H., Villar-Pique, A., Karch, A., Vidal, E., Hermann, P., Schmitz, M., Ferrer Abizanda, I., Zerr, I., & Llorens, F. (2019). CSF neurogranin as a neuronal damage marker in CJD: a comparative study with AD. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(8), 846–853. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320155>
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal Fluid and Plasma Biomarkers in Alzheimer Disease. *Nature Reviews. Neurology*, 6, 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4>
- Bohnen, N. I., Djang, D. S. W., Herholz, K., Anzai, Y., & Minoshima, S. (2012). Effectiveness and safety of 18F-FDG PET in the evaluation of dementia: A review of the recent literature. In *Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 53, Number 1, pp. 59–71). <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.096578>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Acta H ' pathologica Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. In *Acta Neuropathol* (Vol. 82).
- Brosnan MB, Demaria G, Petersen A, et al (2018) Plasticity of the Right-Lateralized Cognitive Reserve Network in Ageing. *Cereb Cortex* 28:1749–1759. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHX085>
- Camporesi, E., Nilsson, J., Brinkmalm, A., Becker, B., Ashton, N. J., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2020). Fluid Biomarkers for Synaptic Dysfunction and Loss. In *Biomarker Insights* (Vol. 15). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1177271920950319>
- Chang MC, Park JM, Pelkey KA, et al (2010) Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. *Nat Neurosci* 13:1090–1097. <https://doi.org/10.1038/NN.2621>
- Chen, Z., Wu, M., Lai, Q., Zhou, W., Wen, X., & Yin, X. (2022). Epigenetic regulation of synaptic disorder in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 16). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.888014>
- Corriveau-Lecavalier, N., Adams, J. N., Fischer, L., Molloy, E. N., & Maass, A. (2024). Cerebral hyperactivation across the Alzheimer's disease pathological cascade. *Brain Communications*, 6(6). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcae376>
- Dai L, Kirsebom B-E, Wang C, et al (2026) Cerebrospinal fluid NPTX1 and NPTXR predict neurodegeneration and clinical progression in Alzheimer's disease. *Nature Communications* 2026. <https://doi.org/10.1038/S41467-026-70472-6>
- Delaby, C., Teunissen, C. E., Blennow, K., Alcolea, D., Arisi, I., Amar, E. B., Beaume, A., Bedel, A., Bellomo, G., Bigot-Corbel, E., Bjerke, M., Blanc-Quintin, M., Boada, M., Bousiges, O., Chapman, M. D., DeMarco, M. L., D'Onofrio, M., Dumurgier, J., Dufour-Rainfray, D., ... Lehmann, S. (2022). Clinical reporting following the quantification of cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: An international overview. *Alzheimer's & Dementia*, 18(10), 1868–1879. <https://doi.org/10.1002/alz.12545>
- Della Rosa PA, Cerami C, Gallivanone F, et al (2014) A standardized [18 F]-FDG-PET template for spatial normalization in statistical parametric mapping of dementia. *Neuroinformatics* 12:575–593
- Diehl-Schmid, J., Grimmer, T., Drzezga, A., Bornschein, S., Riemenschneider, M., Förstl, H., Schwaiger, M., & Kurz, A. (2007). Decline of cerebral glucose metabolism in frontotemporal dementia: a longitudinal 18F-FDG-PET-study. *Neurobiology of Aging*, 28(1), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.002>

- Díez-Guerra, F. J. (2010). Neurogranin, a link between calcium/calmodulin and protein kinase C signaling in synaptic plasticity. *IUBMB Life*, 62(8), 597–606. <https://doi.org/10.1002/iub.357>
- Duara, R., & Barker, W. (2022). Heterogeneity in Alzheimer's Disease Diagnosis and Progression Rates: Implications for Therapeutic Trials. *Neurotherapeutics*, 19(1), 8–25. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01185-z>
- Dubois, B., Villain, N., Schneider, L., Fox, N., Campbell, N., Galasko, D., Kivipelto, M., Jessen, F., Hanseeuw, B., Boada, M., Barkhof, F., Nordberg, A., Froelich, L., Waldemar, G., Frederiksen, K. S., Padovani, A., Planche, V., Rowe, C., Bejanin, A., ... Frisoni, G. B. (2024). Alzheimer Disease as a Clinical-Biological Construct-An International Working Group Recommendation. *JAMA Neurology*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2024.3770>
- Dujardin, S., Commins, C., Lathuiliere, A., Beerepoot, P., Fernandes, A. R., Kamath, T. V., De Los Santos, M. B., Klickstein, N., Corjuc, D. L., Corjuc, B. T., Dooley, P. M., Viode, A., Oakley, D. H., Moore, B. D., Mullin, K., Jean-Gilles, D., Clark, R., Atchison, K., Moore, R., ... Hyman, B. T. (2020). Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 26(8), 1256–1263. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0938-9>
- Edmonds, E. C., McDonald, C. R., Marshall, A., Thomas, K. R., Eppig, J., Weigand, A. J., Delano-Wood, L., Galasko, D. R., Salmon, D. P., & Bondi, M. W. (2019). Early versus late MCI: Improved MCI staging using a neuropsychological approach. *Alzheimer's and Dementia*, 15(5), 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.12.009>
- Ewers M, Luan Y, Frontzkowski L, et al (2021) Segregation of functional networks is associated with cognitive resilience in Alzheimer's disease. *Brain* 144:.. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAB112>
- Frisoni GB, Festari C, Massa F, et al (2024) European intersocietal recommendations for the biomarker-based diagnosis of neurocognitive disorders. *Lancet Neurol* 23:302–312. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00447-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00447-7)
- Filippi, L., Chiaravalloti, A., Bagni, O., & Schillaci, O. (2018). F-labeled radiopharmaceuticals for the molecular neuroimaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease. In *Am J Nucl Med Mol Imaging* (Vol. 8, Number 4). [www.ajnmmsi.us/](http://www.ajnmmsi.us/)
- Fyfe, I. (2015). Neurogranin in the CSF signals early Alzheimer disease and predicts disease progression. *Nature Reviews Neurology*, 11(11), 609–609. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.178>
- Galasko, D., Xiao, M., Xu, D., Smirnov, D., Salmon, D. P., Dewit, N., Vanbrabant, J., Jacobs, D., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., & Worley, P. (2019). Synaptic biomarkers in CSF aid in diagnosis, correlate with cognition and predict progression in MCI and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 5(1), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.11.002>
- Garibotto, V., Herholz, K., Boccardi, M., Picco, A., Varrone, A., Nordberg, A., Nobili, F., & Ratib, O. (2017). Clinical validity of brain fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a biomarker for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. In *Neurobiology of Aging* (Vol. 52, pp. 183–195). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.033>
- Garrido-García, A., de Andrés, R., Jiménez-Pompa, A., Soriano, P., Sanz-Fuentes, D., Martínez-Blanco, E., & Díez-Guerra, F. J. (2019). Neurogranin Expression Is Regulated by Synaptic Activity and Promotes Synaptogenesis in Cultured

- Hippocampal Neurons. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7321–7337.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1593-3>
- Gómez de San José, N., Massa, F., Halbgebauer, S., Oeckl, P., Steinacker, P., & Otto, M. (2022). Neuronal pentraxins as biomarkers of synaptic activity: from physiological functions to pathological changes in neurodegeneration. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 129, Number 2, pp. 207–230). Springer.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-021-02411-2>
- Graff-Radford, J., Yong, K. X. X., Apostolova, L. G., Bouwman, F. H., Carrillo, M., Dickerson, B. C., Rabinovici, G. D., Schott, J. M., Jones, D. T., & Murray, M. E. (2021). New insights into atypical Alzheimer’s disease in the era of biomarkers. In *The Lancet Neurology* (Vol. 20, Number 3, pp. 222–234). Lancet Publishing Group.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30440-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30440-3)
- Guedj E, Varrone A, Boellaard R, et al (2022) EANM procedure guidelines for brain PET imaging using [18F]FDG, version 3. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 49:632–651.  
<https://doi.org/10.1007/s00259-021-05603-w>
- Hansson, O., Lehmann, S., Otto, M., Zetterberg, H., & Lewczuk, P. (2019). Advantages and disadvantages of the use of the CSF Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 42/40 ratio in the diagnosis of Alzheimer’s Disease. In *Alzheimer’s Research and Therapy* (Vol. 11, Number 1, pp. 1–15). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0485-0>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer’s Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hawrylycz, M. J., Lein, E. S., Guillozet-Bongaarts, A. L., Shen, E. H., Ng, L., Miller, J. A., Van De Lagemaat, L. N., Smith, K. A., Ebbert, A., Riley, Z. L., Abajian, C., Beckmann, C. F., Bernard, A., Bertagnolli, D., Boe, A. F., Cartagena, P. M., Mallar Chakravarty, M., Chapin, M., Chong, J., ... Jones, A. R. (2012). An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*, 489(7416), 391–399. <https://doi.org/10.1038/nature11405>
- Herholz, K., Salmon, E., Perani, D., Baron, J. C., Holthoff, V., Frölich, L., Schönknecht, P., Ito, K., Mielke, R., Kalbe, E., Zündorf, G., Delbeuck, X., Pelati, O., Anchisi, D., Fazio, F., Kerrouche, N., Desgranges, B., Eustache, F., Beuthien-Baumann, B., ... Heiss, W. D. (2002). Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *NeuroImage*, 17(1), 302–316.  
<https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1208>
- Hersi, M., Irvine, B., Gupta, P., Gomes, J., Birkett, N., & Krewski, D. (2017). Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer’s disease: A systematic review of the evidence. *NeuroToxicology*, 61, 143–187.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.03.006>
- Jack, C. R., Andrews, J. S., Beach, T. G., Buracchio, T., Dunn, B., Graf, A., Hansson, O., Ho, C., Jagust, W., McDade, E., Molinuevo, J. L., Okonkwo, O. C., Pani, L., Rafii, M. S., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., Sperling, R., Teunissen, C. E., & Carrillo, M. C. (2024). Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer’s disease: Alzheimer’s Association Workgroup. *Alzheimer’s and Dementia*, 20(8), 5143–5169. <https://doi.org/10.1002/alz.13859>
- Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., ... Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a

- biological definition of Alzheimer's disease. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 14, Number 4, pp. 535–562). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
- Jagust, W. J., Teunissen, C. E., & DeCarli, C. (2023). The complex pathway between amyloid & cognition: implications for therapy. *The Lancet Neurology*, 22(9), 847–857. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00128-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00128-X)
- Jia, J., Ning, Y., Chen, M., Wang, S., Yang, H., Li, F., Ding, J., Li, Y., Zhao, B., Lyu, J., Yang, S., Yan, X., Wang, Y., Qin, W., Wang, Q., Li, Y., Zhang, J., Liang, F., Liao, Z., & Wang, S. (2024). Biomarker Changes during 20 Years Preceding Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 390(8), 712–722. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2310168>
- Jones, D. T., Knopman, D. S., Gunter, J. L., Graff-Radford, J., Vemuri, P., Boeve, B. F., Petersen, R. C., Weiner, M. W., & Jack, C. R. (2016). Cascading network failure across the Alzheimer's disease spectrum. *Brain*, 139(2), 547–562. <https://doi.org/10.1093/brain/awv338>
- Kanaan, N. M., Pigino, G. F., Brady, S. T., Lazarov, O., Binder, L. I., & Morfini, G. A. (2013). Axonal degeneration in Alzheimer's disease: When signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Experimental Neurology*, 246, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.003>
- Kester, M. I., Teunissen, C. E., Crimmins, D. L., Herries, E. M., Ladenson, Jack. H., Scheltens, P., van der Flier, W. M., Morris, J. C., Holtzman, D. M., & Fagan, A. M. (2015). Neurogranin as a Cerebrospinal Fluid Biomarker for Synaptic Loss in Symptomatic Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 72(11), 1275. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.1867>
- Kovács, R. A., Vadász, H., Bulyáki, E., Török, G., Tóth, V., Mátyás, D., Kun, J., Hunyadi-Gulyás, E., Fedor, F. Z., Csincsi, A., Medzihradsky, K., Homolya, L., Juhász, G., Kékesi, K. A., Józsi, M., Györfy, B. A., & Kardos, J. (2021). Identification of Neuronal Pentraxins as Synaptic Binding Partners of C1q and the Involvement of NP1 in Synaptic Pruning in Adult Mice. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599771>
- Li, K., Wei, Q., Liu, F. F., Hu, F., Xie, A. J., Zhu, L. Q., & Liu, D. (2018). Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease: A $\beta$ , Tau, and Epigenetic Alterations. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 3021–3032. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0533-3>
- Libiger, O., Shaw, L. M., Watson, M. H., Nairn, A. C., Umaña, K. L., Biarnes, M. C., Canet-Avilés, R. M., Jack, C. R., Breton, Y. A., Cortes, L., Chelsky, D., Spellman, D. S., Baker, S. A., Raghavan, N., & Potter, W. Z. (2021). Longitudinal CSF proteomics identifies NPTX2 as a prognostic biomarker of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 17(12), 1976–1987. <https://doi.org/10.1002/alz.12353>
- Llano, D. A., Devanarayan, P., & Devanarayan, V. (2023). CSF peptides from VGF and other markers enhance prediction of MCI to AD progression using the ATN framework. *Neurobiology of Aging*, 121, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2022.07.015>
- Lleó, A., Núñez-Llaves, R., Alcolea, D., Chiva, C., Balateu-Paños, D., Colom-Cadena, M., Gomez-Giro, G., Muñoz, L., Querol-Vilaseca, M., Pegueroles, J., Rami, L., Lladó, A., Molinuevo, J. L., Tainta, M., Clarimón, J., Spires-Jones, T., Blesa, R., Fortea, J., Martínez-Lage, P., ... Belbin, O. (2019). Changes in synaptic proteins precede neurodegeneration markers in preclinical Alzheimer's disease cerebrospinal fluid\*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(3), 546–560. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001290>

- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. In *Cell* (Vol. 179, Number 2, pp. 312–339). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- Lubben N, Ensink E, Coetzee GA, Labrie V (2021) The enigma and implications of brain hemispheric asymmetry in neurodegenerative diseases. *Brain Commun* 3:. <https://doi.org/10.1093/BRAINCOMMS/FCAB211>
- Magistretti, P. J. M., & Magistretti'', M. (2000). Cellular bases of functional brain imaging: insights from neuron-glia metabolic coupling. In *Brain Research* (Vol. 886). [www.elsevier.com/locate/bres](http://www.elsevier.com/locate/bres)
- Marcus, C., Mena, E., & Subramaniam, R. M. (2014). Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease. In *Clinical Nuclear Medicine* (Vol. 39, Number 10, pp. e413–e426). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000000547>
- Massa, F., Chincarini, A., Bauckneht, M., Raffa, S., Peira, E., Arnaldi, D., Pardini, M., Pagani, M., Orso, B., Donegani, M. I., Brugnolo, A., Biassoni, E., Mattioli, P., Girtler, N., Guerra, U. P., Morbelli, S., & Nobili, F. (2022). Added value of semiquantitative analysis of brain FDG-PET for the differentiation between MCI-Lewy bodies and MCI due to Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(4), 1263–1274. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05568-w>
- Massa, F., Halbgebauer, S., Barba, L., Oeckl, P., Gómez de San José, N., Bauckneht, M., Lanfranchi, F., Vigo, T., Arnaldi, D., Pardini, M., Morbelli, S., Chincarini, A., Barthel, H., Otto, M., & Nobili, F. (2022). Exploring the brain metabolic correlates of process-specific CSF biomarkers in patients with MCI due to Alzheimer's disease: preliminary data. *Neurobiology of Aging*, 117, 212–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2022.03.019>
- Massa, F., Martinuzzo, C., Gómez de San José, N., Pelagotti, V., Kreshpa, W., Abu-Rumeileh, S., Barba, L., Mattioli, P., Orso, B., Brugnolo, A., Girtler, N., Vigo, T., Arnaldi, D., Serrati, C., Uccelli, A., Morbelli, S., Chincarini, A., Otto, M., & Pardini, M. (2024). Cerebrospinal fluid NPTX2 changes and relationship with regional brain metabolism metrics across mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease. *Journal of Neurology*, 271(4), 1999–2009. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-12154-7>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Mecca, A. P., Chen, M. K., O'Dell, R. S., Naganawa, M., Toyonaga, T., Godek, T. A., Harris, J. E., Bartlett, H. H., Zhao, W., Nabulsi, N. B., Wyk, B. C. V., Varma, P., Arnsten, A. F. T., Huang, Y., Carson, R. E., & van Dyck, C. H. (2020). In vivo measurement of widespread synaptic loss in Alzheimer's disease with SV2A PET. *Alzheimer's and Dementia*, 16(7), 974–982. <https://doi.org/10.1002/alz.12097>
- Meftah, S., & Gan, J. (2023). Alzheimer's disease as a synaptopathy: Evidence for dysfunction of synapses during disease progression. In *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2023.1129036>
- Mendes, A. J., Ribaldi, F., Pievani, M., Boccalini, C., Garibotto, V., & Frisoni, G. B. (2025). Validating the Amyloid Cascade Through the Revised Criteria of Alzheimer's Association Workgroup 2024 for Alzheimer Disease. *Neurology*, 104(11). <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000213675>

- Milà-Alomà, M., Brinkmalm, A., Ashton, N. J., Kvartsberg, H., Shekari, M., Operto, G., Salvadó, G., Falcon, C., Gispert, J. D., Vilor-Tejedor, N., Arenaza-Urquijo, E. M., Grau-Rivera, O., Sala-Vila, A., Sanchez-Benavides, G., González-De-Echávarri, J. M., Minguillon, C., Fauria, K., Niñerola-Baizán, A., Perissinotti, A., ... Suárez-Calvet, M. (2021). CSF Synaptic Biomarkers in the Preclinical Stage of Alzheimer Disease and Their Association With MRI and PET A Cross-sectional Study. *Neurology*, 97(21), E2065–E2078. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000012853>
- Minoshima, S., Foster, N. L., Sima, A. A. F., Frey, K. A., Albin, R. L., & Kuhl, D. E. (2001). Alzheimer's disease versus dementia with Lewy bodies: Cerebral metabolic distinction with autopsy confirmation. *Annals of Neurology*, 50(3), 358–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ana.1133>
- Molinuevo, J. L., Ayton, S., Batrla, R., Bednar, M. M., Bittner, T., Cummings, J., Fagan, A. M., Hampel, H., Mielke, M. M., Mikulskis, A., O'bryant, S., Scheltens, P., Sevigny, J., Shaw, L. M., Soares, H. D., Tong, G., Trojanowski, J. Q., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2018). Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathologica*, 136, 821–853. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1932-x>
- Mons, N., Enderlin, V., Jaffard, R., & Huguieret, P. (2001). Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, 79(4), 859–867. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00646.x>
- Morbelli, S., Brugnolo, A., Bossert, I., Buschiazzo, A., Frisoni, G. B., Galluzzi, S., Van Berckel, B. N. M., Ossenkoppele, R., Perneczky, R., Drzezga, A., Didic, M., Guedj, E., Sambuceti, G., Bottoni, G., Arnaldi, D., Picco, A., De Carli, F., Pagani, M., & Nobili, F. (2015). Visual Versus semi-quantitative analysis of 18F-FDG-PET in Amnesic MCI: An European Alzheimer's Disease Consortium (EADC) project. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(3), 815–826. <https://doi.org/10.3233/JAD-142229>
- Morbelli, S., Garibotto, V., Van De Giessen, E., Arbizu, J., Chételat, G., Drezgza, A., Hesse, S., Lammertsma, A. A., Law, I., Pappata', S., Payoux, P., & Pagani, M. (2015). A Cochrane review on brain [18F]FDG PET in dementia: limitations and future perspectives. In *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 42, Number 10, pp. 1487–1491). Springer Berlin. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3098-2>
- Morbelli S, Perneczky R, Drzezga A, et al (2013) Metabolic Networks Underlying Cognitive Reserve in Prodromal Alzheimer Disease: A European Alzheimer Disease Consortium Project. *Journal of Nuclear Medicine* 54:894–902. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.112.113928>
- Mosconi, L. (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease: FDG-PET studies in MCI and AD. In *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 32, Number 4, pp. 486–510). <https://doi.org/10.1007/s00259-005-1762-7>
- Murray, C. J. L., & Lopez, A. D. (2013). Measuring the Global Burden of Disease. *New England Journal of Medicine*, 369(5), 448–457. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1201534>
- Nakashima, T., Nakayama, N., Miwa, K., Okumura, A., Soeda, A., & Iwama, T. (2007). Focal Brain Glucose Hypometabolism in Patients with Neuropsychologic Deficits after Diffuse Axonal Injury. *American Journal of Neuroradiology*, 28(2), 236 LP – 242.

- Nilsson, J., Cousins, K. A. Q., Gobom, J., Portelius, E., Chen-Plotkin, A., Shaw, L. M., Grossman, M., Irwin, D. J., Trojanowski, J. Q., Zetterberg, H., Blennow, K., & Brinkmalm, A. (2023). Cerebrospinal fluid biomarker panel of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Alzheimer's & Dementia*, 19(5), 1775–1784. <https://doi.org/10.1002/alz.12809>
- Nilsson, J., Gobom, J., Sjödin, S., Brinkmalm, G., Ashton, N. J., Svensson, J., Johansson, P., Portelius, E., Zetterberg, H., Blennow, K., & Brinkmalm, A. (2021). Cerebrospinal fluid biomarker panel for synaptic dysfunction in alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/dad2.12179>
- Nilsson, J., Pichet Binette, A., Palmqvist, S., Brum, W. S., Janelidze, S., Ashton, N. J., Spotorno, N., Stomrud, E., Gobom, J., Zetterberg, H., Brinkmalm, A., Blennow, K., & Hansson, O. (2024). Cerebrospinal fluid biomarker panel for synaptic dysfunction in a broad spectrum of neurodegenerative diseases. *Brain*, 147(7), 2414–2427. <https://doi.org/10.1093/brain/awae032>
- Nobili, F., Arbizu, J., Bouwman, F., Drzezga, A., Agosta, F., Nestor, P., Walker, Z., Boccardi, M., Festari, C., Altomare, D., Gandolfo, F., & Orini, S. (2018). European Association of Nuclear Medicine and European Academy of Neurology recommendations for the use of brain 18 F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in neurodegenerative cognitive impairment and dementia: Delphi consensus. In *European Journal of Neurology* (Vol. 25, Number 10, pp. 1201–1217). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.13728>
- Nobili, F., Festari, C., Altomare, D., Agosta, F., Orini, S., Van Laere, K., Arbizu, J., Bouwman, F., Drzezga, A., Nestor, P., Walker, Z., & Boccardi, M. (2018). Automated assessment of FDG-PET for differential diagnosis in patients with neurodegenerative disorders. In *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 45, Number 9, pp. 1557–1566). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4030-3>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Oh, H. S.-H., Urey, D. Y., Karlsson, L., Zhu, Z., Shen, Y., Farinas, A., Timsina, J., Duggan, M. R., Chen, J., Guldner, I. H., Morshed, N., Yang, C., Western, D., Ali, M., Le Guen, Y., Trelle, A., Herukka, S.-K., Rauramaa, T., Hiltunen, M., ... Wyss-Coray, T. (2025). A cerebrospinal fluid synaptic protein biomarker for prediction of cognitive resilience versus decline in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 31(5), 1592–1603. <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03565-2>
- Pelagotti V, Plantone D, D'Amico F, et al (2025) [18F]FDG PET metabolic correlates of cerebrospinal fluid TAR DNA-binding protein 43 in prodromal Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 213:107014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2025.107014>
- Perani, D., Della Rosa, P. A., Cerami, C., Gallivanone, F., Fallanca, F., Vanoli, E. G., Panzacchi, A., Nobili, F., Pappatà, S., Marcone, A., Garibotto, V., Castiglioni, I., Magnani, G., Cappa, S. F., Gianolli, L., Drzezga, A., Perneczky, R., Didic, M., Guedj, E., ... Caroli, A. (2014). Validation of an optimized SPM procedure for FDG-PET in dementia diagnosis in a clinical setting. *NeuroImage: Clinical*, 6, 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2014.10.009>

- Perna, A., Marathe, S., Dreos, R., Falquet, L., Akarsu Egger, H., & Auber, L. A. (2021). Revealing NOTCH-dependencies in synaptic targets associated with Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 115, 103657. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103657>
- Petersen, R. C., Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., & Fratiglioni, L. (2014). Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *Journal of Internal Medicine*, 275(3), 214–228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/joim.12190>
- Petersen, R. C., Lopez, O., Armstrong, M. J., Getchius, T. S. D., Ganguli, M., Gloss, D., Gronseth, G. S., Marson, D., Pringsheim, T., Day, G. S., Sager, M., Stevens, J., & Rae-Grant, A. (2018). Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment report of the guideline development, dissemination, and implementation. *Neurology*, 90(3), 126–135. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000004826>
- Phelps, M. E., Huang, S. C., Hoffman, E. J., Selin, C., Sokoloff, L., & Kuhl, D. E. (1979). Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: Validation of method. *Annals of Neurology*, 6(5), 371–388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ana.410060502>
- Pini, L., Allali, G., Imbimbo, B. P., Germani, M., & Corbetta, M. (2026). Brain connectivity as a new target for Alzheimer's disease therapy? *Brain*, 149(2), 432–438. <https://doi.org/10.1093/brain/awaf404>
- Planalp, E. M., Langhough, R. E., Jonaitis, E. M., Van Hulle, C. A., Wilson, R. E., Kollmorgen, G., Quijano-Rubio, C., Okonkwo, O. C., Bendlin, B. B., Asthana, S., Blennow, K., Zetterberg, H., & Johnson, S. C. (2025). Synaptic markers are associated with cognitive decline after accounting for amyloid burden among an at-risk Alzheimer's disease cohort. *Scientific Reports*, 15(1), 19399. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-04319-3>
- Portelius, E., Olsson, B., Höglund, K., Cullen, N. C., Kvartsberg, H., Andreasson, U., Zetterberg, H., Sandelius, Å., Shaw, L. M., Lee, V. M. Y., Irwin, D. J., Grossman, M., Weintraub, D., Chen-Plotkin, A., Wolk, D. A., McCluskey, L., Elman, L., McBride, J., Toledo, J. B., ... Blennow, K. (2018). Cerebrospinal fluid neurogranin concentration in neurodegeneration: relation to clinical phenotypes and neuropathology. *Acta Neuropathologica*, 136(3), 363–376. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1851-x>
- Portelius, E., Zetterberg, H., Skillbäck, T., Törnqvist, U., Andreasson, U., Trojanowski, J. Q., Weiner, M. W., Shaw, L. M., & Mattsson, N. (2015). Cerebrospinal fluid neurogranin: relation to cognition and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Brain*, 138(11), 3373–3385. <https://doi.org/10.1093/brain/awv267>
- Protas, H. D., Chen, K., Langbaum, J. B. S., Fleisher, A. S., Alexander, G. E., Lee, W., Bandy, D., De Leon, M. J., Mosconi, L., Buckley, S., Truran-Sacrey, D., Schuff, N., Weiner, M. W., Caselli, R. J., & Reiman, E. M. (2013). Posterior cingulate glucose metabolism, hippocampal glucose metabolism, and hippocampal volume in cognitively normal, late-middle-aged persons at 3 levels of genetic risk for alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 70(3), 320–325. <https://doi.org/10.1001/2013.jamaneurol.286>
- Provost, K., La Joie, R., Strom, A., Iaccarino, L., Edwards, L., Mellinger, T. J., Pham, J., Baker, S. L., Miller, B. L., Jagust, W. J., & Rabinovici, G. D. (2021). Crossed cerebellar diaschisis on 18F-FDG PET: Frequency across neurodegenerative syndromes and association with 11C-PIB and 18F-Flortaucipir. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(9), 2329–2343. <https://doi.org/10.1177/0271678X211001216>

- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Rajendran, L., & Paolicelli, R. C. (2018). Microglia-mediated synapse loss in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 38(12), 2911–2919. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1136-17.2017>
- Represa, A., Deloulme, J., Sensenbrenner, M., Ben-Ari, Y., & Baudier, J. (1990). Neurogranin: immunocytochemical localization of a brain-specific protein kinase C substrate. *The Journal of Neuroscience*, 10(12), 3782–3792. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-12-03782.1990>
- Robert A. Fishman. (1992). *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system* (P. ©1992 Saunders, Ed.).
- Robertson IH (2014) A right hemisphere role in cognitive reserve. *Neurobiol Aging* 35:1375–1385. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.028>
- Sathe, G., Albert, M., Darrow, J., Saito, A., Troncoso, J., Pandey, A., & Moghekar, A. (2021). Quantitative proteomic analysis of the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 156(6), 988–1002. <https://doi.org/10.1111/jnc.15116>
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. In *The Lancet* (Vol. 397, Number 10284, pp. 1577–1590). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Schöll, M., Damián, A., & Engler, H. (2014). Fluorodeoxyglucose PET in neurology and psychiatry. In *PET Clinics* (Vol. 9, Number 4, pp. 371–390). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2014.07.005>
- Schöll, M., Maass, A., Mattsson, N., Ashton, N. J., Blennow, K., Zetterberg, H., & Jagust, W. (2019). Biomarkers for tau pathology. In *Molecular and Cellular Neuroscience* (Vol. 97, pp. 18–33). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.12.001>
- Schultz, A. P., Chhatwal, J. P., Hedden, T., Mormino, E. C., Hanseeuw, B. J., Sepulcre, J., Huijbers, W., LaPoint, M., Buckley, R. F., Johnson, K. A., & Sperling, R. A. (2017). Phases of hyperconnectivity and hypoconnectivity in the default mode and salience networks track with amyloid and tau in clinically normal individuals. *Journal of Neuroscience*, 37(16), 4323–4331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3263-16.2017>
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science*, 298(5594), 789–791. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>
- Soldan, A., Oh, S., Ryu, T., Pettigrew, C., Zhu, Y., Moghekar, A., Xiao, M., Pontone, G. M., Albert, M., Na, C., & Worley, P. (2023). <scp>NPTX2</scp> in Cerebrospinal Fluid Predicts the Progression From Normal Cognition to Mild Cognitive Impairment. *Annals of Neurology*, 94(4), 620–631. <https://doi.org/10.1002/ana.26725>
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack, C. R., Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M., Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., ... Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 7(3), 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003>
- Südhof, T. C. (2018). Towards an Understanding of Synapse Formation. In *Neuron* (Vol. 100, Number 2, pp. 276–293). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.040>

- Swanson, A., & Willette, A. A. (2016). Neuronal Pentraxin 2 predicts medial temporal atrophy and memory decline across the Alzheimer's disease spectrum. *Brain, Behavior, and Immunity*, 58, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.148>
- Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, et al (2009) A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 73:1914–1922. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2>
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791–1800. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1791>
- Thientunyakit, T., Muangpaisan, W., & Minoshima, S. (2025). 18F-FDG PET for Dementia Evaluation: Co-pathologies, New Diseases, and Its Roles in the Era of Antiamyloid Treatment. In *Seminars in Nuclear Medicine* (Vol. 55, Number 4, pp. 526–537). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2025.04.007>
- Thorsell, A., Bjerke, M., Gobom, J., Brunhage, E., Vanmechelen, E., Andreasen, N., Hansson, O., Minthon, L., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2010). Neurogranin in cerebrospinal fluid as a marker of synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1362, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.073>
- Toledo, J. B., Arnold, S. E., Raible, K., Brettschneider, J., Xie, S. X., Grossman, M., Monsell, S. E., Kukull, W. A., & Trojanowski, J. Q. (2013). Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain*, 136(9), 2697–2706. <https://doi.org/10.1093/brain/awt188>
- Tu, Y., Law, G. R., Ellison, G. T. H., & Gilthorpe, M. S. (2010). Ratio index variables or ANCOVA? Fisher's cats revisited. *Pharmaceutical Statistics*, 9(1), 77–83. <https://doi.org/10.1002/pst.377>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Varrone A, Asenbaum S, Vander Borgh T, et al (2009) EANM procedure guidelines for PET brain imaging using [18 F] FDG, version 2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36:2103
- Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 17, Number 1, pp. 5–21). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Wang, Z., Wang, X., Zou, H., Dai, Z., Feng, S., Zhang, M., Xiao, G., Liu, Z., & Cheng, Q. (2020). The Basic Characteristics of the Pentraxin Family and Their Functions in Tumor Progression. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01757>
- Watson, C. M., Dammer, E. B., Ping, L., Duong, D. M., Modeste, E., Carter, E. K., Johnson, E. C. B., Levey, A. I., Lah, J. J., Roberts, B. R., & Seyfried, N. T. (2023). Quantitative Mass Spectrometry Analysis of Cerebrospinal Fluid Protein Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Scientific Data*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02158-3>
- Wellington, H., Paterson, R. W., Portelius, E., Törnqvist, U., Magdalinou, N., Fox, N. C., Blennow, K., Schott, J. M., & Zetterberg, H. (2016). Increased CSF neurogranin

- concentration is specific to Alzheimer disease. *Neurology*, 86(9), 829–835.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002423>
- Xiang, Y., Xin, J., Le, W., & Yang, Y. (2020). Neurogranin: A Potential Biomarker of Neurological and Mental Diseases. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.584743>
- Xiao MF, Roh SE, Zhou J, et al (2021) A biomarker-authenticated model of schizophrenia implicating NPTX2 loss of function. *Sci Adv* 7:6935.  
<https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABF6935>
- Xiao, M.-F., Xu, D., Craig, M. T., Pelkey, K. A., Chien, C.-C., Shi, Y., Zhang, J., Resnick, S., Pletnikova, O., Salmon, D., Brewer, J., Edland, S., Wegiel, J., Tycko, B., Savonenko, A., Reeves, R. H., Troncoso, J. C., McBain, C. J., Galasko, D., & Worley, P. F. (2017). NPTX2 and cognitive dysfunction in Alzheimer's Disease. *ELife*, 6, e23798. <https://doi.org/10.7554/eLife.23798>
- Xu, D., Hopf, C., Reddy, R., Cho, R. W., Guo, L., Lanahan, A., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., O'Brien, R. J., & Worley, P. (2003). Narp and NP1 Form Heterocomplexes that Function in Developmental and Activity-Dependent Synaptic Plasticity. *Neuron*, 39(3), 513–528. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00463-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00463-X)
- Zhong, L., Cherry, T., Bies, C. E., Florence, M. A., & Gerges, N. Z. (2009). Neurogranin enhances synaptic strength through its interaction with calmodulin. *The EMBO Journal*, 28(19), 3027–3039. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.236>
- Zhou J, Wade SD, Graykowski D, et al (2023) The neuronal pentraxin Nptx2 regulates complement activity and restrains microglia-mediated synapse loss in neurodegeneration. *Sci Transl Med* 15:eadf0141.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adf0141>
- Zimmer, E. R., Parent, M. J., Souza, D. G., Leuzy, A., Lecrux, C., Kim, H. I., Gauthier, S., Pellerin, L., Hamel, E., & Rosa-Neto, P. (2017). [18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nature Neuroscience*, 20(3), 393–395.  
<https://doi.org/10.1038/nn.4492>

